

CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SALMONELLA RAUH-MUTANTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Mahmoud El-Sabbagh
aus
Kairo / Ägypten

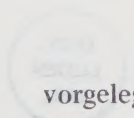
1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SALMONELLA RAUH-MUTANTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.



vorgelegt von
Mahmoud El-Sabbagh
aus
Kairo / Ägypten

1978

Dekan: Prof. Dr. Schopfer
Leiter der Arbeit: Prof. Dr. O. Westphal
Referent: Prof. Dr. O. Westphal
Koreferent:

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses:

Ein Teil dieser Arbeit ist veröffentlicht worden:

"Effect of ionizing radiation on biological and
biochemical properties of Salmonella minnesota
R595 lipopolysaccharide."

Galanos, C., Bertók, L., El-Sabbagh, M. and Füst, G.
4th European Immunology Meeting
Budapest 1978, Abstr. pg. 105.



Herrn Prof. Dr. Otto WESTPHAL, dem Leiter dieser Arbeit, danke ich für Anregungen und die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Max-Planck-Institut für Immunbiologie.

Herrn Dr. Otto LÜDERITZ, in dessen Abteilung ich die Arbeit durchführte, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Seine hilfreichen Ratschläge und stete Unterstützung haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ein Teil der Arbeit wurde im Labor von Herrn Dr. Chris GALANOS ausgeführt, dem ich für seine ständige Anleitung besonders danke.

Mein Dank gilt auch allen Freunden und Kollegen, insbesondere Herrn Dr. E.Th. RIETSCHEL, Herrn Dr. V. LEHMANN und Frl. MINNER für ihre freundliche Hilfe und zahlreiche Ratschläge und Diskussionen. Frau Dr. E. RUSCHMANN und Frl. K. KLETTNER danke ich dafür, daß sie mich in serologische Arbeiten eingeführt haben. Frl. K. KLETTNER hat sehr viele Präparate getestet. Frau Dr. I. FROMME danke ich für die Hilfe bei der Gaschromatographie.

Mein Manuskript wurde sprachlich von Herrn Dr. O. LÜDERITZ und Herrn Dr. C. GALANOS redigiert.

Die finanzielle Unterstützung erfolgte durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD).

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	i
ABKÜRZUNGEN	ii
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Vorkommen und Bedeutung der Lipopolysaccharide	1
1.2 Chemische Struktur des Lipopolysaccharids	1
1.2.1 Region I: Struktur der O-spezifischen Seitenkette	4
1.2.2 Biosynthese der O-spezifischen Seitenkette	4
1.2.3 Region II: Struktur des Kern-Oligosaccharids	5
1.2.4 Biosynthese des Kern-Oligosaccharids	6
1.2.5 Region III: Struktur von Lipoid A	7
1.2.6 Biosynthese von Lipoid A	10
1.3 Wild-(S-)Formen und Mutanten (R-Formen) mit unvollständigen Lipopolysacchariden	11
1.3.1 S-Form	11
1.3.2 SR-Form	11
1.3.3 R-Form	12
1.4 Isolierung und Reinigung von Lipopolysacchariden	12
1.5 Physikochemische Eigenschaften der Lipopolysaccharide, Salzformen	14
1.6 Physikochemische Eigenschaften des Lipoid A	17
1.7 Biologische Aktivitäten der Lipopolysaccharide	17
1.8 Wechselwirkung zwischen Lipopolysacchariden und Komplement	17
1.9 Ziel der Arbeit	19
2. ERGEBNISSE	21
2.1 Chemische Analyse von Lipopolysacchariden aus verschiedenen <u>Salmonella</u> R Mutanten	21
2.1.1 Glucosamin	21
2.1.2 Phosphor	21
2.1.3 2-Keto-3-deoxy-D-mannooctonat (KDO)	25
2.1.4 Galaktose, Glucose und Heptose	25
2.1.5 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose (AraN)	25
2.1.6 Amine und Polyamine	29
2.1.7 Fettsäuren	36
2.2 Serologische Analyse der Lipopolysaccharide	36
2.2.1 Hämagglutination	36
2.2.2 Hämagglutinations-Hemmung	43
2.3 Reaktion der R-Form-LPSs mit Komplement	44

3	DISKUSSION	48
4	MATERIAL UND METHODEN	68
4.1	Bakterienstämme und ihre Züchtung	68
4.2	Extraktion der Lipopolysaccharide	68
4.3	Elektrodialyse und Salz-Formen von Lipopoly- sacchariden	68
4.4	Analytische Methoden	69
4.4.1	Allgemeine Methoden	69
4.4.2	Polyamine	69
4.4.3	4-Amino-4-deoxy-L-arabinose	70
4.4.4	Dünnschichtchromatographie und Papier- elektrophorese	70
4.4.5	Gaschromatographie der Fettsäuren	71
4.4.6	Gaschromatographie der Zucker	72
4.5	Biologische Tests	73
4.5.1	Komplement-Fixations-Test (Komplement- Inaktivierung)	73
4.5.2	Hämagglutinations- und Hämagglutinations- Hemmungs-Test	73
5	WIRKUNG VON Co^{60} -GAMMA-BESTRAHLUNG AUF CHEMISCHE ZU- SAMMENSETZUNG UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON <u>SALMONELLA MINNESOTA R595 LIPOPOLYSACCHARID</u>	75
5.1	Einleitung	75
5.2	Ergebnisse	75
5.3	Diskussion	80
5.4	Material und Methoden	80
	LITERATURVERZEICHNIS	81
	LEBENS LAUF	

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 71 Lipopolysaccharid-Präparate (LPS) untersucht, die aus 44 Salmonella-Mutanten durch Phenol/Wasser- (P/W) und/oder Phenol/Chloroform/Petroläther- (PCP) Extraktion erhalten worden waren. Die Mutanten waren 1964 aus S.minnesota, S.ruirū und S.godesberg isoliert worden. Es wurden folgende Analysen durchgeführt: a) Chemische Analysen der Zuckerbausteine Galaktose, Glucose, Heptose, 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, Glucosamin und 4-Aminoarabinose; von Aminen, Polyaminen und Fettsäuren sowie von Phosphat; b) biologische Analysen der LPS zur Bestimmung der Komplement-Reaktivität sowie von serologischen Kreuzreaktionen in verschiedenen Salmonella R Antiseren.

Als Ergebnis dieser Analysen war es möglich, 35 der Lipopolysaccharide in R-Chemotypen einzuordnen. Drei LPSs stammen von nicht mutierten Elternstämmen. Die restlichen 6 LPSs ließen sich nicht einfach typisieren, sie stammen möglicherweise aus Doppelmutanten.

Im Einzelnen wurden gefunden (vergl. dazu Tab. 8) 15 Re-LPSs, 4 Rd₂-LPSs, 2 Rd₁P⁻-LPSs, 3 Rd₁P⁺-LPSs, 3 RcP⁻-LPSs, kein RcP⁺-LPS, 2 Rb-LPSs und 6 Ra-LPSs. Diese Klassifizierung ist nicht definitiv und weitere detaillierte Analysen sind nötig um sie zu sichern. Die Ergebnisse lassen es möglich erscheinen, daß unter den Mutanten Vertreter zweier neuer Klassen identifiziert wurden: Re-LPS mit 2 statt 3 KDO-Resten und Rd-LPS mit 3 statt 2 Heptose-Resten.

Im Rahmen eines weiteren Projektes und in Zusammenarbeit mit Prof. L. Bertók, Budapest, wurde das LPS von S.minnesota R595, einer Re Mutante, gereinigt, mit Co⁶⁰-Gammastrahlen behandelt (in Budapest) und anschließend vergleichend mit dem Ausgangsmaterial analysiert. Wie schon früher an analogen Präparaten gezeigt worden war, tritt mit der Bestrahlung eine Detoxifizierung ein. Es wurde nun gezeigt, daß die Präparate auch chemisch verändert sind. Im Laufe der Bestrahlung wurden einzelne Bausteine des LPS bis zu 50% zerstört.

ABKÜRZUNGEN

Glc	Glucose
Gal	Galaktose
Hep	Heptose
L,D-Hep	L-Glycero-D-mannoheptose
D,D-Hep	D-Glycero-D-mannoheptose
Fuc	Fucose
KDO	2-Keto-3-deoxy-D-mannooctonat
Glc-6-P	Glucose-6-Phosphat
Xyl	Xylose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GalN	Galaktosamin
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
4-AraN	4-Amino-4-deoxy-L-arabinose
UDP-Gal	Uridindiphosphat-Galaktose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylgalaktosamin
P	Phosphor
Pa	Polyamine
P-Äthanolamin (P-EtN)	Phosphoryläthanolamin
FA	Fettsäuren
C ₁₂ , C ₁₄	Laurinsäure, Myristinsäure etc.
Δ^2 C ₁₄	α - β -ungesättigte-Myristinsäure
3-OCH ₃ -C ₁₄	3-Methoxymyristinsäure
3-OH-C ₁₄	D-3- Hydroxymyristinsäure
LPS und LPSS	Lipopolysaccharid und Lipopolysaccharide
mR	<u>Salmonella</u> <u>minnesota</u> R
gR	<u>Salmonella</u> <u>godesberg</u> R
rR	<u>Salmonella</u> <u>ruiru</u> R
PW	Phenol/Wasser
PCP	Phenol/Chloroform/Petroläther
S-Präparat	PW-extrahiertes LPS
G-Präparat	PCP-extrahiertes LPS

TEN	Triäthylamin
ED(-LPS)	Elektrodialysiertes LPS
me	Metall-Kationen
BSA	Rinderserumalbumin
C'	Komplement
ECA	Enterobacterial Common Antigen
ACL	Antigen Carrier Lipid
FDNB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
M	Wanderungsgeschwindigkeit

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Vorkommen und Bedeutung der Lipopolysaccharide:

Die Zellhülle gram-negativer Bakterien (Abb. 1) besteht aus drei übereinander liegenden Schichten (Freer und Salton, 1971; Braun und Hantke, 1974; Costerton et al., 1974):

a) der inneren (cytoplasmatischen) Membran, b) der Mureinschicht ("rigid layer") und c) der äußeren Membran. Der Zellwand ist oftmals, z.B. bei *E.coli*, eine weitere Schicht aufgelagert, die als Kapsel bezeichnet wird (Kauffmann, 1954).

Diese fehlt jedoch bei *Salmonella*.

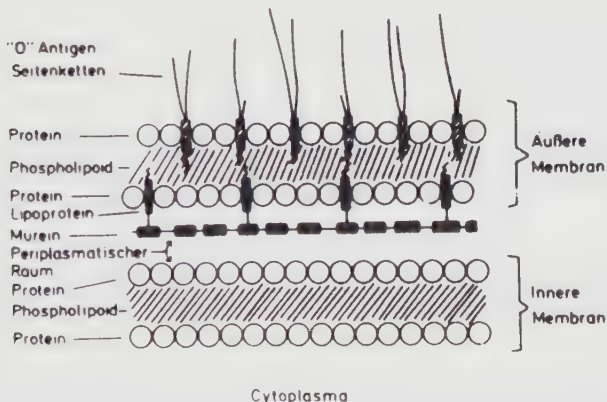


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Zellhülle gram-negativer Bakterien nach Schnaitman (1971).

Die äußere Membran liegt als plastische Schicht auf der Außenseite der bakteriellen Zellwand. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist sie - analog zur inneren Membran - als "unit membrane" sichtbar. Sie besteht aus Phospholipiden, Lipopoly-

saccharid (LPS) und Proteinen (Nikaido, 1973), wobei die einzelnen Komponenten nicht starr angeordnet sind, sondern - temperaturabhängig - eine laterale Mobilität aufweisen (Mühlradt et al., 1974). Die äußere Membran besitzt Eigenschaften eines Molekularsiebs (Nakae und Nikaido, 1975; Decad und Nikaido, 1976) und stellt eine Permeabilitätsbarriere dar. Durch sie wird das Eindringen von Makromolekülen von außen, aber auch das Austreten von periplasmatischen Enzymen und Bindungsproteinen verhindert (Nikaido, 1973).

Lipopolysaccharide sind an der Außenseite der äußeren Membran lokalisiert (Mühlradt und Golecki, 1975; Nikaido, 1975). Sie stellen die O-Antigene, die hitze-stabilen Hauptantigene, sowie die Endotoxine der gram-negativen Bakterien dar. Sie sind entscheidend an der Pathogenese enterobakterieller Infektionskrankheiten (Typhus, Ruhr u.a.) beteiligt und verantwortlich für die Auslösung von Begleiterscheinungen wie Fieber, Schock und schließlich auch Tod. Immunisierung mit intakten Bakterien oder LPSs führt zur Produktion von Antikörpern, die gegen den Polysaccharid-Teil des LPS-Moleküls gerichtet sind.

Die Bedeutung der Endotoxine bei Infektionskrankheiten hat diese Substanzklasse zum Gegenstand intensiver chemischer, biochemischer und biologisch-medizinischer Untersuchungen gemacht.

1.2 Chemische Struktur des Lipopolysaccharids:

Strukturchemische Untersuchungen an LPSs verschiedener Gattungen, vor allem an Salmonella, haben gezeigt, daß sich das LPS-Molekül in 3 Regionen aufgliedern läßt (vgl. Abb. 2). Die Aufteilung des Moleküls in drei Bereiche ergibt sich aus der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung, aus der Tatsache, daß die einzelnen Bereiche verschiedene biologische Funktionen ausüben, sowie aufgrund biosynthetischer und genetischer Untersuchungen.

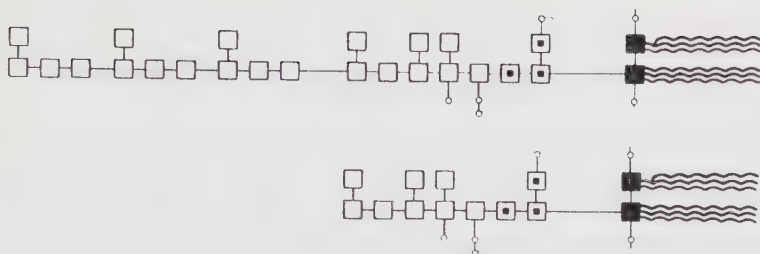


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von Lipopolysacchariden.
o = Phosphat, ~ = Äthanolamin, ~ = Fettsäuren, □ = 2-Keto-3-deoxy-D-mannooctonat (KDO) und ■ = Zucker.

Die O-spezifischen Seitenketten (Region I) und das Kern-Oligosaccharid (Region II) bestehen aus einem hydrophilen Heteropolysaccharid. Das Lipoid A (Region III) stellt ein kovalent gebundenes, hydrophobes Lipoid dar (Lüderitz et al., 1971). — Die Aufklärung von Struktur und Biosynthese des Polysaccharid-Teils wurde wesentlich erleichtert durch die Isolierung von Verlustmutanten, die aufgrund genetischer Defekte ein LPS ohne O-spezifische Seitenkette und mit unvollständiger Kernregion synthetisieren. Solche Mutanten werden (aus Gründen der Kolonie-Morphologie) als Rauh (R)-Mutanten bezeichnet. R-Mutanten bilden LPSs, denen die Region I ganz fehlt und die, je nach Enzymblock, einen mehr oder weniger vollständigen Kern (Region II) synthetisieren (Lüderitz, 1970). Es ist gelungen, aus einer einzigen Salmonella-Spezies, z.B. aus S.minnesota

oder S.typhimurium, eine Serie von inkompletten R-Formen zu isolieren.

1.2.1 Region I: Struktur der O-spezifischen Seitenketten:

Die O-spezifischen Seitenketten bestehen aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten ("repeating units") und zeichnen sich durch eine hohe Spezies Variation bezüglich Zuckerzusammensetzung und Struktur aus. Sie sind Träger der serologischen Spezies-Spezifität, der sogenannten O-Spezifität der Bakterien. Die Struktur der O-spezifischen Seitenketten (O-Antigene) bildet die Grundlage für das serologische Verhalten und damit für die Klassifizierung von Salmonella in die verschiedenen Serotypen (Kauffmann-White Schema, Kauffmann, 1954). Chemische Untersuchungen haben zu den Beziehungen von Serotypen und Chemotypen geführt (Lüderitz et al., 1966). Abb. 3 zeigt als Beispiel die chemische Struktur des Lipopolysaccharids von Salmonella typhimurium (Lüderitz, 1970) mit der O-spezifischen Seitenkette, dem Kern-Oligosaccharid und Lipoid A.

1.2.2 Biosynthese der O-spezifischen Seitenkette:

Die Biosynthese der O-Antigene ist vor allem bei den Salmonella-Gruppen B (Zeleznick et al., 1965; Weiner et al., 1965) und E (Wright et al., 1965; Dankert et al., 1966) studiert worden. Sie besteht im wesentlichen aus drei Schritten, die sich in der Cytoplasmamembran vollziehen, wobei die Zwischenstufen an ein Lipoid, das Antigen Carrier Lipid (ACL), gebunden sind (Abb. 4 für S.newington):

- 1- Die Bildung sich wiederholender Trisaccharide (Mannosyl-rhamnosyl-galaktose) durch spezifische Transferasen.
- 2- Die Polymerisation der Trisaccharide durch das Enzym Polymerase.
- 3- Die Bindung des polymerisierten O-Antigens an das Kern-Oligosaccharid durch das Enzym O-Antigen-LPS-Translocase.

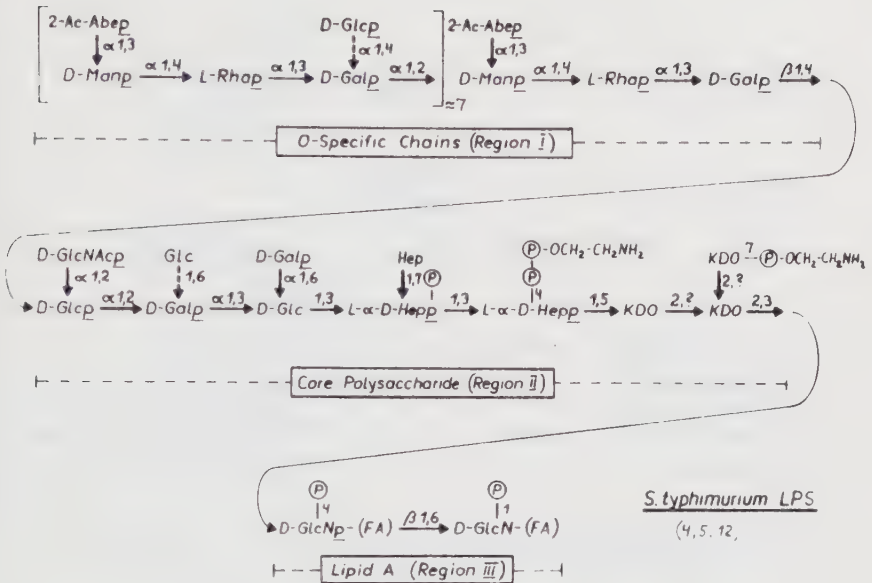


Abb. 3: Chemische Struktur des Lipopolysaccharids von *S. typhimurium* (Lüderitz, 1970)
p = pyranosid, FA = Fettsäuren

1.2.3 Region II: Struktur des Kern-Oligosaccharids:

Das Kern-Oligosaccharid weist bei Vergleich verschiedener Bakterienspezies weitaus geringere Struktur-Variation auf als die O-Ketten und besteht meist aus einem Hexose-Pentasaccharid (äußerer Kern) und einem Oligosaccharid, das aus Heptose und 2-Keto-3-deoxy-D-mannooctonat (KDO) (innerer Kern) besteht. *Salmonella* Spezies besitzen ein identisches Kern-Oligosaccharid (Lüderitz et al., 1971; Beckmann et al., 1964). Der innere Kern besitzt eine Anhäufung von ionischen Gruppen, wie Phosphatreste, Carboxylgruppen (KDO) und Aminogruppen (Äthanolamin, siehe Abb. 3).

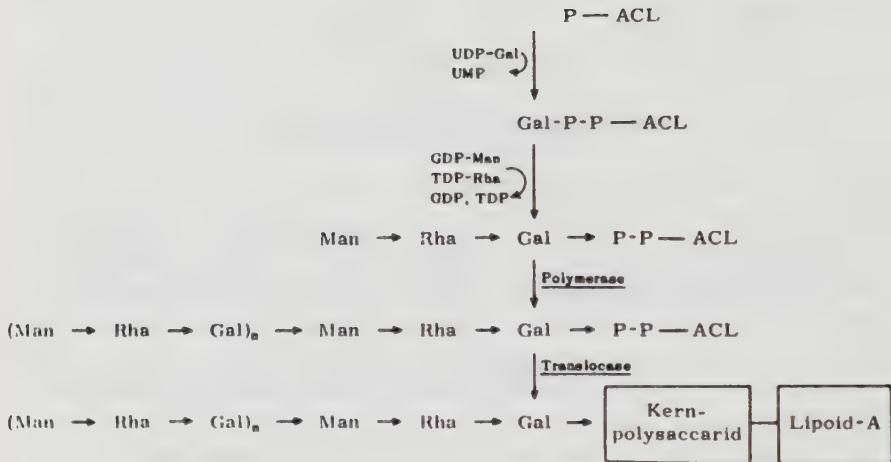


Abb. 4: Biosynthese der O-spezifischen Kette des LPS von Salmonella newington (Robbins und Wright, 1971).

1.2.4 Biosynthese des Kern-Oligosaccharids:

Die Biosynthese des Kerns vollzieht sich unabhängig von der Synthese der O-spezifischen Ketten. KDO-Lipoid A dient als Akzeptor für den Transfer der Kernzucker, die einer nach dem anderen auf den wachsenden Kern übertragen werden (Abb. 5). Lipoid A dient als Anker an die cytoplasmatische Membran, an der auch diese Synthese stattfindet (Osborn und Rothfield, 1971). Der Biosyntheseweg kann an Abb. 8 (siehe unten) abgelesen werden: Er vollzieht sich von oben (Re) nach unten (Ra).

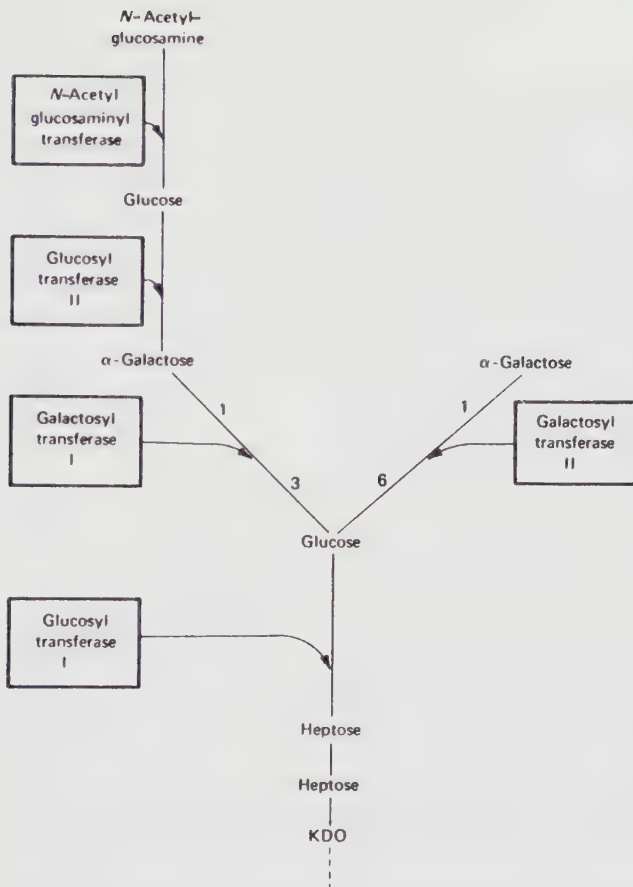


Abb. 5: Biosynthese des Kerns von *Salmonella*-LPSs (Osborn und Rothfield, 1971).

1.2.5 Region III: Struktur von Lipid A:

Freies *Salmonella* Lipid A kann aus LPS durch milde Hydrolyse abgespalten werden. Dabei wird die ketosidische Bindung, die den Kern über KDO mit Lipid A verbindet, gespalten. Freies

Lipoid A enthält weder Bestandteile des Kerns noch der O-Kette. Lipoid A stellt das endotoxische Prinzip der LPSs dar.

Salmonella Lipoid A besteht aus einem hydrophilen Teil, Glucosamin-Phosphat, und einem hydrophoben Teil, den langkettigen Fettsäuren. Das Grundgerüst von Lipoid A wird von einem D-Glucosaminyl- β -1,6-D-Glucosamin-Disaccharid (Gmeiner et al., 1969) gebildet, welches einen glycosidisch-gebundenen (C1) und einen ester-gebundenen Phosphat-Rest (C'4) trägt. Beide Phosphatgruppen sind, wie in neuerer Zeit gefunden wurde (Hase und Rietschel, 1977), teilweise substituiert: Die Phosphatgruppe an C'4 trägt eine 4-Amino-4-deoxy-L-arabinosyl-Gruppe, die Phosphatgruppe an C1 eine Phosphoryläthanolamin-Gruppe. Der Substitutionsgrad variiert und ist wahrscheinlich abhängig von Kulturbedingungen (Mühlradt et al., 1977). Bei diesen Substituenten sind die Aminogruppen und Hydroxylgruppen frei. Die Hydroxyl-Gruppe an C'3 trägt im intakten LPS den ketosidisch gebundenen KDO-Rest des Kerns.

Die Aminogruppen und alle restlichen Hydroxylgruppen des Glucosamin-Disaccharids sind mit langkettigen Fettsäuren besetzt. Diese sind verantwortlich für die lipophilen Eigenschaften des Lipoid A. Beide Aminogruppen tragen D-3-Hydroxymyristinsäure-Reste. Die Hydroxylgruppen sind mit Laurinsäure-, Palmitinsäure- und D-3-Hydroxymyristinsäure-Resten verestert, wobei die letzteren an der Hydroxylgruppe einen Myristinsäure-Rest in Esterbindung tragen. In einigen Molekülen ist Myristinsäure durch L-2-Hydroxymyristinsäure ersetzt (Rietschel et al., 1977, Bryn und Rietschel, 1978). Die Salmonella Lipoid A-Formel ist in Abb. 6 wiedergegeben.

Die 3-Hydroxyfettsäuren repräsentieren in Salmonella-Lipoid A 55 - 75% der Gesamt-Fettsäuren. Sie stellen charakteristische Marker für Lipoid A dar, da sie nur in Lipoid A vorkommen.

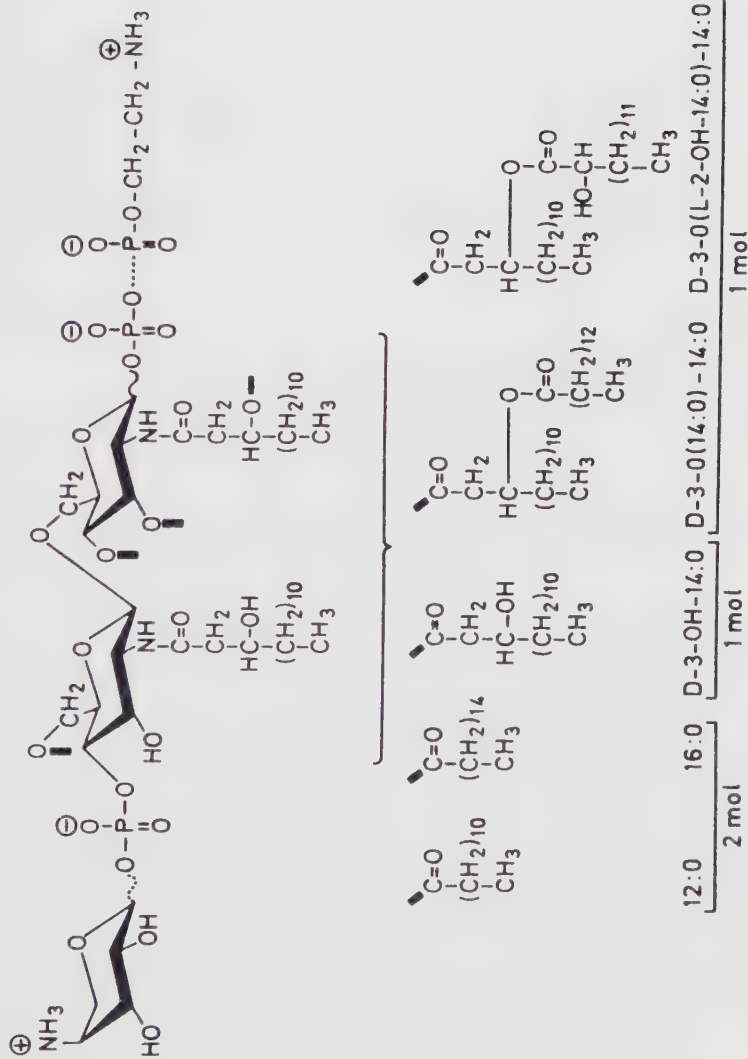


Abb. 6: Chemische Struktur von Lipoid A aus Salmonella

Es ist seit langem bekannt, daß Lipoid A (ebenso wie das Kern-Oligosaccharid), Polyamine und Kationen enthält, die die sauren Gruppen des Moleküls neutralisieren (siehe unten). Erst in neuerer Zeit ist die Bedeutung dieser Ionen deutlich geworden. Polyamine und zweiwertige Kationen tragen zur Aggregation der Lipopolysaccharide und Lipoid A bei und beeinflussen damit nicht nur die physikalischen, sondern auch die biologischen Eigenschaften. Dies wurde deutlich, als gezeigt wurde, daß mittels Elektrodialyse die Ionen entfernt werden können. Die dann erhaltenen LPS-"Säuren" konnten durch Neutralisieren mit verschiedenen Basen in einheitliche Salzformen überführt und deren Eigenschaften studiert werden (Galanos und Lüderitz, 1976). Die Ergebnisse werden unten diskutiert.

1.2.6 Biosynthese von Lipoid A:

Es sind in der letzten Zeit einige Informationen über die Biosynthese von Lipoid A bekannt geworden, nachdem die Isolierung von temperatur-sensitiven KDO-defekten Mutanten aus S.typhimurium gelang. Wie ihr Studium gezeigt hat (Osborn et al., 1974) synthetisieren die Zellen zunächst ein unvollständiges Lipoid A (Lipoid A-Precursor I), das nur ester- und amidgebundene D-3-Hydroxymyristinsäure enthält, dem aber KDO und die nicht-hydroxylierten Fettsäuren fehlen. Dieser Lipoid A-Precursor I dient als Akzeptor für die polaren Gruppen 4-Aminoarabinose, Phosphoryläthanolamin (Precursor II) und KDO. In einem letzten Schritt werden die unhydroxylierten Fettsäuren (C12, C14 und C16) übertragen. Das erste Molekül bei der LPS-Biosynthese, welches komplettes Lipoid A enthält, ist das Re-LPS (vgl. Abb. 7; Lehmann et al., 1978; Munson et al., 1978).

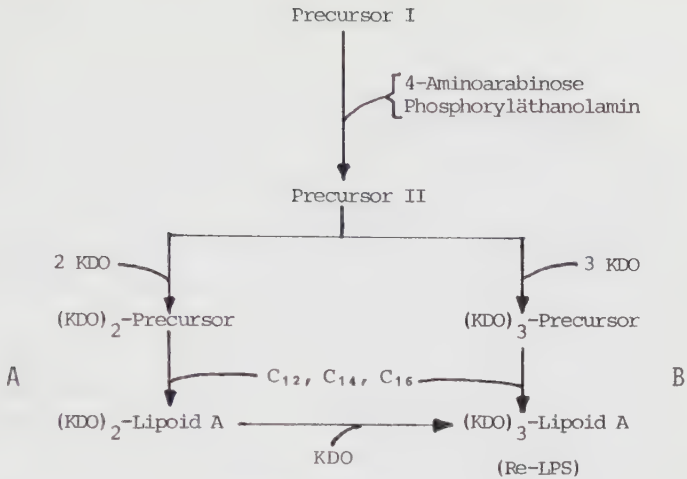


Abb. 7: Die letzten Schritte der Lipid A-Biosynthese bei Salmonella. Ob zunächst 2 KDO und später das 3. KDO (A), oder ob 3 KDO hintereinander (B) übertragen werden, ist noch nicht bekannt (Osborn et al., 1974; Lehmann et al., 1978). Munson et al., 1978 haben Hinweise dafür, daß der Precursor zunächst nur 2 KDO aufnimmt.

1.3 Wild-(S-)-Formen und Mutanten (R-Formen) mit unvollständigen Lipopolysacchariden:

1.3.1 S-Form: S-Form-LPS wird von den Wild-Stämmen der Salmonellen synthetisiert (S = smooth: glatte Oberfläche der Agarkolonien). Diese Klasse von LPSs ist hinsichtlich ihrer Struktur komplett und besteht aus drei Regionen (I, II und III, vgl. Abb. 2). S-Form-LPS (z.B. von S.typhimurium) ist schon beschrieben worden, (vgl. Abb. 3).

1.3.2 SR-Form: Diese Klasse von LPS hat Eigenschaften, die zwischen S- und R-Formen liegen (SR = semi-rough) (Naide et al., 1965, Nikaido et al., 1966, Mäkelä und Sarvas, 1969). SR-LPSs besitzen die kompletten Regionen III (Lipoid A) und II (Kern). Statt der O-Kette enthalten sie nur eine einzige Wiederholungseinheit an den Kern gebunden. Ihr synthetischer

Defekt liegt in der Polymerase (O-Seitenkette-Polymerase) (Lüderitz et al., 1971).

1.3.3 R-Form: Aus Salmonella sind Mutanten isoliert worden, deren LPS keine O-spezifischen Seitenketten besitzen, sogenannte R-Mutanten (R = rough: rauhe Oberfläche der Agarkolonien). Es gibt zwei Hauptgruppen von R-Mutanten:

- a) Ra Mutanten, deren LPSS komplettes Kern-Oligosaccharid ("core") besitzen. Ihnen fehlen die O-Ketten, deren Biosynthese in diesen Mutanten defekt ist.
- b) Rb-Re Mutanten, deren LPSS inkomplettes Kern-Oligosaccharid besitzen. Ihnen fehlen die O-Ketten und Teile des Kerns. Diese Mutanten sind hinsichtlich der Kern-Biosynthese defekt. Entsprechend dem ausgefallenen Syntheseschritt synthetisieren die Mutanten ein größeres oder kleineres Kern-Oligosaccharid-Fragment, an Lipoid A gebunden (s. z.B. Galanos et al., 1977)

Abb. 8 zeigt eine Serie von Kern-defekten Lipopolysacchariden, die aus Salmonella minnesota R-Mutanten isoliert wurden (Lüderitz et al., 1971). Analoge Reihen von R-Form LPSS wurden später aus Mutanten von anderen Salmonella-Spezies, E.coli, Shigella, Proteus u.a. isoliert (Galanos et al., 1977).

1.4 Isolierung und Reinigung von Lipopolysacchariden:

Zur Isolierung von LPSS aus gram-negativen Bakterien sind verschiedene Methoden ausgearbeitet worden (Lüderitz et al., 1968). Zwei Methoden werden hier wegen ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit erwähnt. Die Phenol/Wasser-Methode (PW) (Westphal et al., 1952) und die Phenol/Chloroform/Petroläther-Methode (PCP) (Galanos et al., 1969).

Das mit der Phenol/Wasser-Methode isolierte LPS enthält meist 1 - 3% Protein sowie kleine Mengen an Nukleinsäure und Glucan.

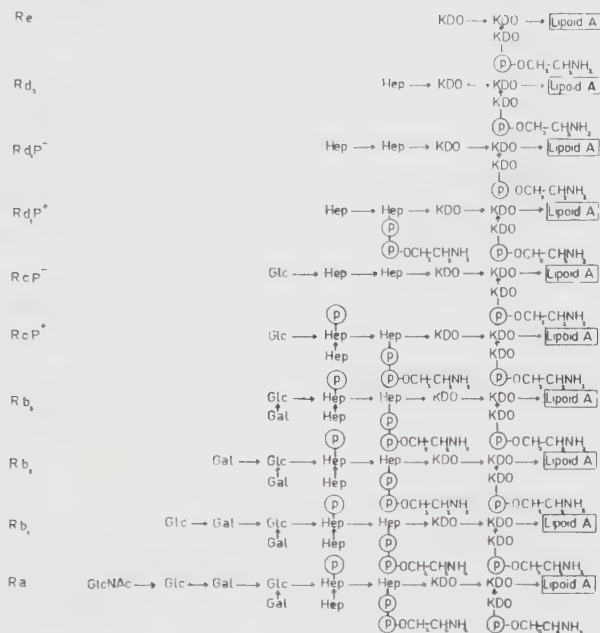


Abb. 8: Struktur von Kern-defekten LPSs aus Salmonella R-Mutanten (Lüderitz et al., 1971).

Das Phenol-Wasser-Verfahren ist sehr allgemein anwendbar und vor allem zur Isolierung von S-Form-Lipopolysacchariden geeignet. Die Verwendung dieser Methode zur Isolierung von R-Form-LPS ist unbefriedigend, weil in vielen Fällen die Ausbeuten gering sind (besonders bei Rc, Rd und Re Mutanten; Galanos et al., 1969; Lüderitz et al., 1966). Mit der Phenol/Chloroform/Petroläther-Methode werden hochgereinigte, wasserlösliche R-Form-LPSs, frei von Nukleinsäure, Protein und Glucan in hoher Ausbeute erhalten. Die Phenol/Chloroform/Petroläther-Methode ist spezifisch für die Isolierung von R-Form-LPS. S-Form-LPSs werden nicht extrahiert.

Mit Phenol/Chloroform/Petroläther kann man R-Form-LPS auch aus "leaky"-Mutanten (die sowohl S- wie R-Form-LPS synthetisieren) isolieren. Anschließend kann das S-Form-LPS aus dem Bakterienrückstand mit Phenol/Wasser extrahiert werden. Es wurde kürzlich gefunden, daß Phenol/Wasser-isolierte S-Form LPSs nun in Phenol/Chloroform/Petroläther-Mischung löslich wurden. Da Nukleinsäuren, Proteine und Glucane in Phenol/Chloroform/Petroläther unlöslich sind, stellt die Kombination beider Verfahren eine gute Methode zur Isolierung und Reinigung von S-Form-LPS dar (Galanos et al., 1977).

1.5 Physikochemische Eigenschaften der Lipopolysaccharide, Salzformen:

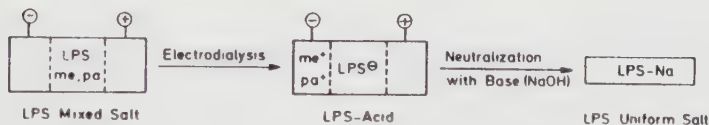
Da LPS in hochaggregierter Form vorliegt, ist die Bestimmung von Molekulargewichten nicht ohne weiteres möglich. Aufgrund der chemischen Formel beträgt das Molekulargewicht von Lipoid A etwa 2.000, vom Kern etwa 2.000 und von der O-spezifischen Kette etwa 10.000 (bei 10 Pentasaccharid-Einheiten von je ca. 1.000), und daher das Molekulargewicht einer LPS-Einheit ca. 14.000 (Galanos et al., 1977). Für das R-Form-LPS, das keine O-spezifische Kette hat, beträgt das theoretische MG 3.000 - 4.000.

Unter desaggregierenden Bedingungen ist für Salmonella london (S-Form-LPS) ein MG von ca. 20.000 (Malchow et al., 1969), für S.typhimurium Rc LPS ca. 10.000 (Romeo et al., 1970) und für S.minnesota Re LPS ca. 5.900 (Kasai et al., 1970) gefunden worden.

Die Aggregation beruht einmal auf hydrophoben Wechselwirkungen von Fettsäuren im Lipoid A, zum anderen auf ionischen Bindungen. Solche Bindungen sind etwa zwischen sauren (Phosphat- und KDO-) und basischen (Äthanolamin-) Gruppen benachbarter Moleküle möglich. Andererseits können Polyamine und divalente Kationen LPS-Moleküle durch Neutralisieren saurer Gruppen vernetzen.

Den Effekt der Kationen und Polyamine kann man studieren, wenn man die Quantität und Qualität dieser Ionen gezielt verändert.

Unabhängig von der Isolierungsmethode enthalten LPSs eine Mischung von basischen Substanzen, metallische Kationen wie Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} u.a., und Amine, wie Äthanolamin, Putrescin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$), Kadaverin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$), Spermidin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) und Spermin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$). Die Elektrodialyse hat sich als eine geeignete Methode erwiesen, die basischen Substanzen des LPS abzutrennen (Galanos und Lüderitz, 1975). Nach Entfernung der Ionen erhält man die Säure-Form der LPSs, welche dann durch Neutralisation mit einer beliebigen Base in einheitliche Salzformen überführt werden kann (Abb. 9).



me = metal cation
pa = polyamine

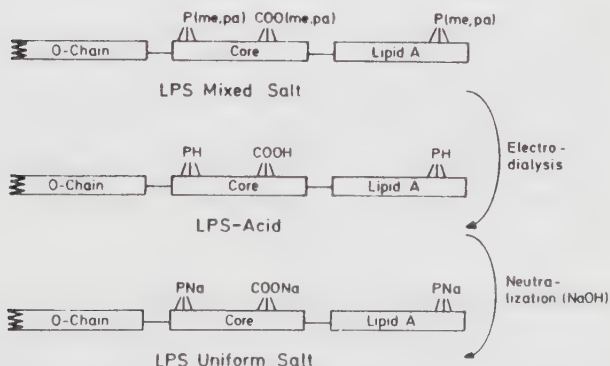


Abb. 9: Prinzip der Elektrodialyse eines LPS (Galanos et al., 1977)
P = Phosphat, me = Metall-Kationen, Pa = Polyamine

Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Salz-Formen verschiedene Aggregationsgrade, Löslichkeit, Viskosität, Opalesszenz und biologische Aktivitäten bedingen. Dies ist auf Abb. 10 dargestellt.

<u>S.abortus equi</u> LPS Salzform	Sedimentations- Koeffizient	Löslichkeit (Wasser)	Komplement- Inaktivierung	Pyrogenität
Triäthylamin (TEN)	9,3	+++	---	+++
Pyridin				
Äthanolamin				
Na ⁺				
K ⁺				
Putrescin	230	+		
Ca ⁺⁺	teilweise löslich	-	+++	+

Abb. 10: Eigenschaften verschiedener Salzformen von S.abortus equi LPS

Es ist bemerkenswert, daß das Triäthylamin-Salz von S-Form LPSs stabil ist in Gegenwart von z.B. zweiwertigen Kationen. Dies ist anders bei R-Form-LPSs. In Gegenwart von Ca⁺⁺ oder Mg⁺⁺ werden die Triäthylamin-Salze von R-Form LPSs in die entsprechenden Salze überführt und präzipitiert. Dies muß man beachten, wenn man solche Salze in z.B. Puffer oder Serum löst (Galanos et al., 1977).

Polyamine im LPS können leicht identifiziert werden, wenn man das LPS mit starker Säure bei 0°C für 2 min. zusammenbringt, dann für 15 Sekunden auf 100°C erhitzt, zentrifugiert und den Überstand der Papierelektrophorese unterwirft.

1.6 Physikochemische Eigenschaften des Lipoid A:

Lipoid A kann aus LPSs durch milde Säure-Hydrolyse als wasser-unlösliches Präzipitat abgespalten werden. Wasser-unlösliches Lipoid A kann in Gegenwart von Triäthylamin in Lösung gebracht werden. Beim Konzentrieren oder Lyophilisieren wird Lipoid A jedoch wieder unlöslich (Westphal et al., 1969). Stabile Lösungen von Lipoid A werden erhalten, wenn es mit Rinderserum-albumin (BSA) komplexiert wird (Lipoid A/BSA) (Galanos et al., 1971). Die Löslichkeit des Lipoid A/BSA-Komplexes in Wasser ist stabil und unverändert nach Lyophilisation. Freies, lösliches Lipoid A kann durch Elektrodialyse und anschließende Neutralisierung mit Triäthylamin erhalten werden. Das Triäthylamin-Salz des Lipoid A ist gut wasserlöslich (Galanos und Lüderitz, 1975), wird aber mit Mg^{++} und Ca^{++} (z.B. Puffer) präzipitiert (Galanos et al., 1977).

1.7 Biologische Aktivitäten der Lipopolysaccharide:

Lipopolysaccharide zeigen nach parenteraler Injektion in experimentellen Tieren ein großes Spektrum von biologischen Aktivitäten, wie z.B. das Schwartzman-Phänomen, pyrogene-Wirkung (Fieber), Tumornekrose, Aktivierung des Komplementsystems, lethale Toxizität, Blutdrucksenkung, Leukopenie und Leukozytose. Höhere Dosen führen zum Schock und zum Tod der Tiere. Da das endotoxische Prinzip der LPSs im Lipoid A lokalisiert ist, werden alle biologischen Aktivitäten nicht nur von den in Abb. 8 aufgeführten inkompletten R-LPSs, sondern gleichermaßen auch von freiem Lipoid A hervorgerufen.

1.8 Wechselwirkung zwischen Lipopolysacchariden und Komplement:

Die Komplementfaktoren (C') bilden eine Gruppe von Serumproteinen, die bei der Immunabwehr und Immunpathologie eine Rolle

spielen. Das C' bindet am Antigen-Antikörper-Komplex. Findet diese Reaktion an Zelloberflächen statt, so kann es zur Lyse kommen (Bakterien, Erythrozyten etc.). Mit Hilfe der spezifischen Hämolyse wird die C'-Aktivität eines Serums bestimmt und titriert (Erythrozyten + Antikörper = "sensibilisierte Erythrozyten" + C' $\longrightarrow$ Lyse: Messung des gelösten Hämoglobins). Mit Hilfe dieses Tests kann einfach gezeigt werden, daß nicht nur Antigen-Antikörper Komplexe die hämolytische Aktivität von C' erniedrigen, sondern daß LPSs (in Abwesenheit von Antiserum) einen gleichen Effekt haben: Inkubation von LPS und C' (im allgemeinen Meerschweinchen-Serum, das einen hohen hämolytischen Titer hat) führt zur Inaktivierung von C'. Es konnte gezeigt werden, daß die Mechanismen der C'-Inaktivierung durch Immunkomplexe einerseits und durch LPSs andererseits verschieden sind (Abb. 11). Beim "klassischen Weg" sind C'1, C'4 und C'2 beteiligt, beim "alternativen Weg" dagegen nicht

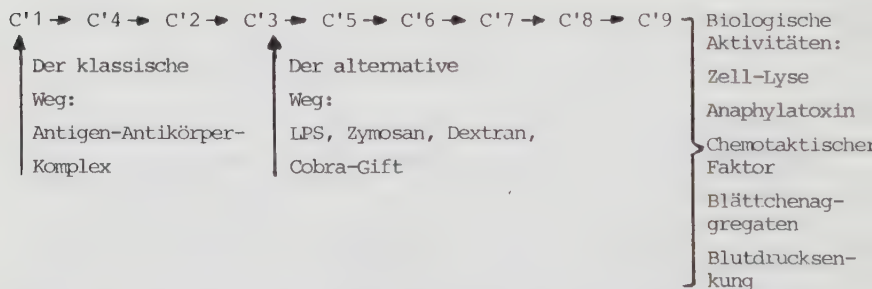


Abb.11: Die Aktivierung des Komplementsystems durch den klassischen Weg und den alternativen Weg mit ihren biologischen Aktivitäten.

Das Studium der LPS/C'-Interaktion hat zu folgenden Ergebnissen geführt (Galanos et al., 1977):

a) LPSs verschiedenen Ursprungs zeigen unterschiedliche Aktivität gegenüber C'. Beispiele von hochaktiven, mittel- und inaktiven LPSs sind bekannt.

b) Die Aktivität von LPSs ist abhängig von der Aggregation, d.h. von der Salzform (s. Abb. 10). Die niedermolekulare Triäthylamin-Form ist inaktiv, für die meisten LPSs sind die Na^{+} - und Ca^{++} -Formen aktiv.

c) Es gibt aber einige Salmonella LPSs, die unabhängig von der Salzform, in der sie vorliegen, nicht mit C' reagieren, z.B. Ra- und Rb-LPSs (vgl. Abb. 8). Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

d) Lipoid A ist hochaktiv gegenüber C', auch wenn es aus C'-inaktiven LPSs gewonnen wurde (Ra-, Rb-LPSs). Es ist in allen Salzformen aktiv, da es stets in Gegenwart von divalenten Kationen reaggregiert.

1.9 Ziel der Arbeit:

Morphologisch rauh-wachsende Salmonella-Mutanten, sogen. R-Mutanten, sind seit langem bekannt. 1953 wurde gezeigt, (Westphal und Lüderitz, 1953), daß diese Mutanten einen Defekt in der LPS-Biosynthese besitzen und daher inkomplettes LPS synthetisieren: Es fehlen die O-spezifischen Ketten. Spätere Arbeiten mit F. Kauffmann vom Statens Serum Institut in Kopenhagen zeigten, daß sich die aus vielen Salmonella Spezies (zufällig aus gealterten Kulturen) isolierten R-Mutanten (je Spezies wurde eine Mutante untersucht) serologisch in zwei Gruppen, RI und RII, einteilen ließen (Kauffmann et al., 1960). Als dann, wieder zufällig, gefunden wurde, daß aus einer Spezies, S. minnesota, RI und RII Mutanten erhalten werden konnten (Lüderitz et al., 1966), wurde die Möglichkeit erwogen, daß vielleicht jede Salmonella-Spezies verschiedenartige Mutationen erleiden könnte, die entsprechend zu einer Serie von LPS-defekten Mutanten führen würden. Frau Dr. J. Schlosshardt, zeitweilig eine Mitarbeiterin bei F. Kauffmann, fand sich bereit, am Institut für Serum- und Impfstoffprüfung, Berlin-Pankow,

eine große Zahl von R-Mutanten zu isolieren, zuerst aus S.minnesota, später aus S.ruiru und S.godesberg (Schlosshardt, 1964).

Nur eine kleine Zahl der erhaltenen Mutanten wurde seinerzeit qualitativ, quantitativ und schließlich strukturell analysiert. Das Ergebnis waren die Strukturen der R-LPSs, die in Abb. 8 wiedergegeben sind. Viele andere damals isolierte Mutanten wurden aufgehoben.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die von Frau Dr. Schlosshardt isolierten Mutanten chemisch zu charakterisieren. Die LPSs waren bereits isoliert worden. Es sollten die Zucker und Fettsäuren, welche die Hauptbestandteile darstellen, analysiert werden. Weiterhin war geplant, die LPSs serologisch zu charakterisieren. Schließlich sollte auch eine biologische Eigenschaft der LPSs, die Reaktion mit Komplement, bestimmt werden, um zu prüfen, ob es wieder, wie in früheren Versuchen, vor allem Ra- und Rb-LPSs sind, die sich in diesem Test als inaktiv erweisen. Es erschien möglich, daß die Ergebnisse dieser Arbeit, die auf der Abb. 8 dargestellte Serie von bislang bekannten inkompletten LPSs erweitern würde.

Es wurde ein weiteres Projekt bearbeitet, gemeinsam mit Prof. L. Bertók vom Radiologischen Institut in Budapest. Lipopolysaccharid, das in Freiburg in besonders reiner Form isoliert und präpariert worden war, wurde in Budapest durch γ -Bestrahlung detoxifiziert. Die bestrahlten LPSs wurden chemisch und hinsichtlich ihrer Komplementaktivität analysiert, um Strahlen-bedingte Veränderungen zu finden (2. Teil der Arbeit, Kapitel 5, S. 75).

2. ERGEBNISSE

2.1 Chemische Analyse von Lipopolysacchariden aus verschiedenen Salmonella R-Mutanten:

In dieser Arbeit wurden 71 LPS-Präparationen aus 44 R-Mutanten chemisch analysiert. Es handelt sich um Mutanten von S.minnesota (mR), S.godesberg (gR) und S.ruiru (rR), die von J. Schlosshardt im Jahre 1964 isoliert wurden (Institut für Serum- und Impfstoffprüfung, Berlin-Pankow, jetzt Potsdam). Vergleichsweise wurden 2 E.coli mitanalysiert. Die Bakterien waren früher mit Phenol/Wasser extrahiert worden (Präparate S). Nach Einführung der PCP-Methode (spezifisch für R-LPS) wurde dieses Verfahren angewandt (Präparate G). In den meisten Fällen wurden daher mehrere Präparate aus der gleichen Mutante analysiert. In einigen Fällen wurden Bakterien in einem ersten Schritt mit PCP, und dann der Rückstand mit Phenol/Wasser extrahiert.

2.1.1 Glucosamin: Glucosamin (GlcN) bildet das Grundgerüst von Lipid A bei Enterobacteriaceen: Das D-Glucosaminyl- β -1,6-D-Glucosamin-Disaccharid (Gmeiner et al., 1969). Glucosamin ist auch Bestandteil des Kern-Oligosaccharids ist in Ra-Mutanten (s. Abb. 8). Außerdem ist Glucosamin Baustein der O-Kette von S.minnesota und S.ruiru LPSs. Ein spezifischer Marker für O-Ketten bei allen 3 Spezies (S.minnesota, S.ruiru und S.godesberg) ist Galaktosamin. Tabelle 1 a-c zeigt die Ergebnisse der Hexosaminbestimmungen.

2.1.2 Phosphor: Phosphor findet sich in LPSs gram-negativer Bakterien sowohl im Lipid A-Teil wie im Kern. Das Glucosamin-Disaccharid trägt einen glycosidisch- (C 1) und einen ester-gebundenen (C'4) Phosphat-Rest. Der erstere ist partiell mit Phosphoryläthanolamin besetzt. Im Kern sind KDO und Heptose partiell mit Phosphatgruppen verestert. Pro LPS-Molekül sollten daher mindestens 2 Mole P gefunden werden. Maximal

Tab. 1: Ergebnisse der Glucosamin-, Phospor- und KDO-Bestimmungen. Die mit *) bezeichneten LPS enthalten zusätzlich Galaktosamin.

GlcN: Morgan-Elson Bestimmung, P: Lowry Methode, KDO: Thiobarbitursäure-Methode, GlcN und GalN: Dünnschichtchromatographie; Werte: % bezogen auf LPS, mR: S.minnesota R, gR: S.godesberg R, rR: S.ruiru R, S = Phenol/Wasser-extrahiert, G = PCP-extrahiert;

Klammern bedeuten, daß die Bakterien zuerst mit PCP und anschließend mit Phenol/Wasser extrahiert werden.

Tab.1a Nr.	Züchtungs- datum	Aus- beute %	LPS aus	Glucosamin %	Phosphor %	KDO %
1	4. 7.74	2	mR 1 G	10,4	2,6	10,3
2	4. 7.74	1	mR 1 S	10,4	2,9	8,6
3	6. 9.74	3	mR 2 G	7,3	4,3	6,8
4	8. 6.74	5	mR 3 G	6,9	2,6	8,7
5	4. 9.74	4	mR 5 G	7,6	2,1	8,0
6	16. 4.75	6	mR 6 G	7,7	1,8	8,3
7	4. 9.74	5	mR 6 G	6,3	2,0	8,5
8	1. 8.73	3	mR 7 G	8,1	2,1	10,1
9	10. 7.74	3	mR 46 G *)	17,9	2,0	3,1
10	4.10.74	5	mR 128 G	7,2	1,4	10,1
11	6. 9.74	5	mR 592 G	11,8	2,0	7,8
12	10. 9.74	0,4	mR 597 G	7,0	2,0	11,4
13	10. 7.74	2	mR 608 G*)	11,7	2,9	7,4
14	10. 7.74	2	mR 608 S*)	12,7	3,2	5,1
15	13. 8.74	4	mR 1000 G	13,0	2,6	9,4
16	13. 8.74	0,1	mR 1000 S	9,3	1,6	6,1
17	6. 8.74	3	mR 1001A G	10,9	2,6	13,0
18	6. 8.74	0,3	mR 1001A S	13,7	2,5	13,3
19	8. 8.74	3	mR 1001B G	13,5	1,7	8,7
20	8. 8.74	0,4	mR 1001B S	12,0	2,4	8,7

Tab. 1b Nr.	Züchtungs- datum	Aus- beute %	LPS aus	Glucosamin %	Phosphor %	KDO %
1	26. 5.71	1	gR 1 G *)	7,0	3,4	5,6
2	8. 2.66	1	gR 1 S *)	8,2	1,9	6,1
3	20. 9.68	6	gR 2 G	11,7	2,8	12,0
4	31. 3.66	6	gR 2 S	7,3	1,6	7,0
5	26. 5.71	3	gR 3 G	10,3	3,0	7,6
6	11. 2.67	2	gR 3 S	11,1	2,3	9,1
7	30. 3.66	1	gR 3 S	10,2	2,3	7,8
8	3. 4.70	4	gR 4 G	11,1	2,4	16,5
9	28. 5.71	4	gR 5 G	14,0	1,5	17,3
10	16. 2.66	0,2	gR 5 S	9,1	3,0	5,9
11	25. 2.70	1	gR 6 G *)	6,1	3,5	6,7
12	4. 6.71	7	gR 7 G	12,3	2,9	15,8
13	31. 3.66	7	gR 7 S	5,2	3,2	9,5
14	25. 2.70	4	gR 8 G	10,0	3,0	16,5
15	31. 3.66	1	gR 8 S	6,9	2,9	8,9
16	4. 6.71	5	gR 9 G	9,0	2,7	19,5
17	30. 3.66	1	gR 9 S	8,6	3,2	14,4
18	9. 6.71	5	gR 10 G	13,0	2,9	17,6
19	30. 3.66	2	gR 10 S	9,3	2,8	17,3
20	10. 6.71	4	gR 11 G	10,2	2,9	16,1
21	31. 3.66	3	gR 11 S *)	9,1	2,6	14,1
22	4. 8.71	4	gR 12 G	10,1	2,9	15,7
23	30. 3.66	1	gR 12 S	9,1	2,9	14,6
24	13. 2.67	3	gR 13 G	10,3	2,8	18,7
25	13. 2.67	5	gR 14 G	11,0	2,9	17,2
26	30. 4.66	1	gR 15 S	2,4	0,6	4,0
27	17. 2.67	0,1	gR 15 S	4,6	0,6	5,1
28	21. 5.70	4	gR 16 G	10,4	2,9	19,5
29	20. 9.68	1	gR 17 G	5,4	4,0	6,6
30	8. 6.70	5	gR 17'G	9,9	3,0	16,2
31	8. 6.70	0,1	gR 17'S	7,3	2,5	12,5
32	1. 7.66	1	gR 17 S	5,4	3,5	6,7

Tab.1b Nr.	Züchtungs- datum	Aus- beute %	LPS aus	Glucosamin %	Phosphor %	KDO %
33	10. 2.67	4	gR 18 G	11,6	2,7	21,2
34	3. 4.70	4	gR 18 G	10,8	2,7	17,9
35	10. 2.67	1	gR 18 S	6,4	2,5	14,6
36	25. 6.71	3	gR 19 S *)	4,6	2,9	3,7
37	1. 7.66	5	gR 19 S *)	4,1	2,5	3,8
38	8. 6.70	3	gR 20 G	7,4	2,5	7,1
39	30. 4.66	1	gR 20 S	4,0	3,8	8,1
40	1. 7.66	1	gR 20 S	4,9	3,8	8,0
41	21. 5.70	2	gR 21 G	7,7	4,0	8,6
42	3. 6.70	6	gR 22 G	6,6	4,4	9,2
43	8. 6.70	3	gR 23 G	6,6	4,4	7,7
44	8. 6.70	3	gR 24 G	6,7	2,4	8,4
45	25. 6.71	3	gR 25 G	6,2	3,6	7,7
46	1. 7.66	1	gR 25 S	5,1	3,3	7,8

Tab.1c Nr.	Züchtungs- datum	Aus- beute %	LPS aus	Glucosamin %	Phosphor %	KDO %
1	14.10.74	3	rR S *)	18,3	2,1	3,0
2	20. 8.74	6	rR 1 G	8,4	2,0	9,3
3	20. 8.74	1	rR 1 S	5,8	3,0	8,1
4	7.10.74	5	rR 630 G	7,9	2,7	12,3
5	20. 8.74	6	rR 541 G	10,2	3,4	9,3
6	12. 6.74	1	coli Re G	12,7	2,6	16,6
7	15. 1.74	5	coli Re 7515 G	12,7	2,7	15,1

können 7 Positionen (partiell) besetzt sein (s. Abb. 8), vorausgesetzt, das LPS enthält Heptose. Tab. 1 a-c zeigt den P-Gehalt der LPSs.

2.1.3 2-Keto-3-deoxy-D-mannooctonat (KDO): Im kompletten LPS-Molekül wie auch in R-LPSs von Salmonellen (S- und R-LPS) finden sich insgesamt drei KDO-Moleküle. Selbst das unvollständigste LPS von Re Mutanten enthält drei KDO-Reste, an Lipoid A gebunden (s. Abb. 8). Die Ketosidbindung vom KDO ist säure-labil. Im Re-LPS werden daher mit JO_4^- /Thiobarbitursäure 3 KDO-Reste erfaßt. Die 1,5-Bindung zwischen der inneren Heptose und dem äußeren KDO-Molekül des Kerns ist säure-resistent und wird unter den Bedingungen der Thiobarbitursäure-Methode nicht gespalten. Daher werden bei Anwesenheit von Heptose in LPSs nur 2 KDO-Moleküle von insgesamt drei Molekülen erfaßt. Die Ergebnisse der KDO-Bestimmungen sind in Tab. 1 a-c aufgeführt.

2.1.4 Galaktose, Glucose und Heptose: Das Kern-Oligosaccharid von LPSs besteht aus einem Hexose-Pentasaccharid mit Glc, Gal und GlcN, (äußerer Kern) und einem Oligosaccharid aus 2-3 Heptose- und 3-KDO-Einheiten (innerer Kern). Glucose, Galaktose und Heptose wurden gaschromatographisch als Alditolacetate bestimmt. Heptose wurde auch kolorimetrisch bestimmt. Weitere Zucker wurden nicht gefunden, außer in wenigen LPSs Fucose (O-spezifischer Zucker in S.godesberg). (s. Tab. 2 a-c).

2.1.5 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose (4-AraN): Es ist bekannt, daß die meisten Salmonella LPSs 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose enthalten. Dieser Aminozucker kann bis zu 20% die estergebundene Phosphatgruppe des Glucosamin-Disaccharid-Grundgerüsts von Lipoid A besetzen (Abb. 6, Volk et al., 1970; Mühlradt et al., 1977). 4-Aminoarabinose ist glycosidisch gebunden und kann durch milde Hydrolyse (0,5N HCl, 37°C, 10-24 Stunden) freigesetzt und papierelektrophoretisch nachgewiesen werden. Abb. 12 zeigt das Elektropherogramm eines Kontroll-LPS

Tab. 2: Ergebnisse der Hexose- und Heptose-Bestimmungen.
 Glc, Gal und Hep: Gaschromatographie der Alditolacetate.
 Hep¹⁾ auch mit H₂SO₄/Cystein (kolorimetrisch).
 Die mit *) bezeichneten LPS enthalten zusätzlich
 Fucose. Bezeichnungen der Präparate sowie weitere Anmerkungen siehe Tab. 1.

Tab.2a Nr.	LPS aus	Galaktose %	Glucose %	Heptose %	Heptose ¹⁾ %
1	mR 1 G	4,7	2,9	8,8	11,8
2	mR 1 S	4,4	3,4	7,2	11,2
3	mR 2 G	8,7	5,2	14,7	24,5
4	mR 3 G	6,1	5,4	11,8	14,0
5	mR 5 G	1,7	5,3	13,5	11,0
6	mR 6 G	1,4	4,8	13,2	11,0
7	mR 6 G	1,7	4,8	13,4	11,0
8	mR 7 G	0,0	0,0	12,6	12,8
9	mR 46 S	17,4	6,3	7,2	10,6
10	mR 128 G	0,0	0,0	15,8	16,2
11	mR 592 G	1,9	5,8	15,2	11,1
12	mR 597 G	0,0	0,0	7,3	7,8
13	mR 608 G	4,8	3,3	12,7	17,2
14	mR 608 S	4,9	4,0	10,2	14,3
15	mR 1000 G	0,0	0,5	8,9	6,8
16	mR 1000 S	1,0	9,8	5,2	4,5
17	mR 1001A G	0,0	0,1	1,1	1,0
18	mR 1001A S	0,0	0,7	2,0	1,7
19	mR 1001B G	1,0	1,0	10,9	8,0
20	mR 1001B S	1,9	2,0	10,3	10,0

Tab.2b Nr.	LPS aus	Galaktose %	Glucose %	Heptose %	Heptose ¹⁾ %
1	gR 1 G *)	5,4	9,5	9,9	15,2
2	gR 1 S *)	8,2	11,9	13,7	19,1
3	gR 2 G	2,6	3,4	5,1	5,9
4	gR 2 S	3,8	4,7	7,5	8,1
5	gR 3 G	2,1	2,1	13,8	16,8
6	gR 3 S	3,1	3,9	17,0	17,2
7	gR 3 S	2,3	3,6	15,7	20,7
8	gR 4 G	0,2	0,0	0,0	0,0
9	gR 5 G	0,4	0,2	0,0	0,0
10	gR 5 S	n.g.	n.g.	n.g.	15,9
11	gR 6 G *)	7,0	12,6	12,7	17,8
12	gR 7 G	0,1	0,6	0,0	0,0
13	gR 7 S	0,2	0,1	0,0	0,2
14	gR 8 G	0,1	0,5	0,0	0,2
15	gR 8 S	0,2	13,5	0,0	0,0
16	gR 9 G	0,4	1,5	0,0	0,3
17	gR 9 S	0,6	1,5	0,0	0,0
18	gR 10 G	0,2	0,2	0,0	0,3
19	gR 10 S	0,2	0,3	0,0	0,0
20	gR 11 G	0,0	0,0	0,0	0,0
21	gR 11 S*)	0,4	0,7	0,0	0,0
22	gR 12 G	0,0	0,0	0,0	1,0
23	gR 12 S	0,2	1,1	0,0	0,0
24	gR 13 G	0,1	0,2	0,0	0,0
25	gR 14 G	0,0	0,0	0,0	0,8
26	gR 15 S	0,3	1,2	0,0	0,0
27	gR 15 S	0,7	2,4	0,0	0,7
28	gR 16 G	0,0	0,5	0,0	1,0
29	gR 17 G	4,5	9,7	13,9	17,0
30	gR 17 G	0,7	1,3	1,3	2,0
31	gR 17 S	2,0	10,2	5,1	6,0
32	gR 17 S	7,2	8,7	11,4	16,2

Tab.2b Nr.	LPS aus	Galaktose %	Glucose %	Heptose %	Heptose ¹⁾ %
33	gR 18 G	0,0	0,0	0,0	0,5
34	gR 18 G	0,0	0,0	0,0	0,3
35	gR 18 S	0,1	2,5	0,0	0,0
36	gR 19 S*)	4,8	19,7	10,6	14,0
37	gR 19 S*)	4,8	19,1	10,1	12,4
38	gR 20 G	0,0	0,1	12,5	14,5
39	gR 20 S	1,5	2,2	14,2	15,7
40	gR 20 S	3,3	3,6	13,0	16,2
41	gR 21 G	0,0	0,9	12,7	11,7
42	gR 22 G	5,2	6,7	8,7	9,6
43	gR 23 G	6,3	8,7	11,2	11,2
44	gR 24 G	1,9	2,8	13,9	13,3
45	gR 25 G	2,0	2,8	13,0	10,6
46	gR 25 S	3,5	3,7	14,1	15,1

Tab.2C	LPS aus	Galaktose %	Glucose %	Heptose %	Heptose ¹⁾ %
1	rR S	14,9	8,1	6,9	10,8
2	rR 1 G	0,8	2,2	14,6	17,1
3	rR 1 S	0,7	3,1	12,7	27,0
4	rR 630 G	0,0	0,0	7,9	7,1
5	rR 541 G	0,8	2,1	15,9	19,9
6	coli Re G	0,0	0,0	0,0	0,2
7	coli Re 7515 G	0,0	0,0	0,0	0,5

(S.minnesota R595), auf dem unter anderen Hydrolyseprodukten 4-Aminoarabinose zu erkennen ist.

In analoger Weise wurde 4-Aminoarabinose in den R-LPSs nachgewiesen, und jeweils aufgrund der Fleckengrößen die relative Menge geschätzt. Als Vergleich diente mR595-LPS, welches gleich behandelt wurde. Als Beispiel zeigt Abb. 12 die Analyse der Präparate Nr. mR 5-10.

Auf das Elektropherogramm wurde jeweils der Überstand von 875 µg hydrolysiertem LPS aufgetragen, zusammen mit Standard-Zuckern. Auf dem mit Ag^+/OH^- bzw. Ninhydrin gefärbten Elektropherogrammen waren folgende Substanzen erkennbar: KDO, Glucose-6-phosphat (Standard), Phosphoryläthanolamin, Glucose (Standard, neutral), Glucosamin (Standard), 4-Aminoarabinose, Lysin, Äthanolamin, Spermin, Kadaverin/Spermidin, Putrescin (betr. Polyamine, siehe Kap. 2.1.6). Aminoarabinose färbt mit Ninhydrin gelb-braun, Lysin, das etwas schneller wandert, violett. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

2.1.6 Amine und Polyamine:

Es ist seit langem bekannt, daß Polyamine in LPSs salzartig gebunden vorkommen, und die Elektropherogramme, die zum Nachweis der 4-Aminoarabinose angefärbt worden waren, zeigten alle auch Flecke, die den Polyaminen entsprachen (siehe Abb. 12). Obwohl bislang quantitative Bestimmungen von Polyaminen in LPSs nicht durchgeführt wurden, konnte aufgrund der Fleckengrößen angenommen werden, daß die relativen Quantitäten in den verschiedenen LPSs sehr unterschiedlich sind.

Es wurde daher geprüft, wie hoch der Amingehalt in verschiedenen Präparationen von LPSs ist, die nach gleichem Verfahren zu verschiedenen Zeiten aus verschiedener Bakterienchargen von der gleichen Mutante isoliert worden waren und inwieweit dieser Gehalt schwankt. Als Beispiel wurde das LPS von S.minnesota R595

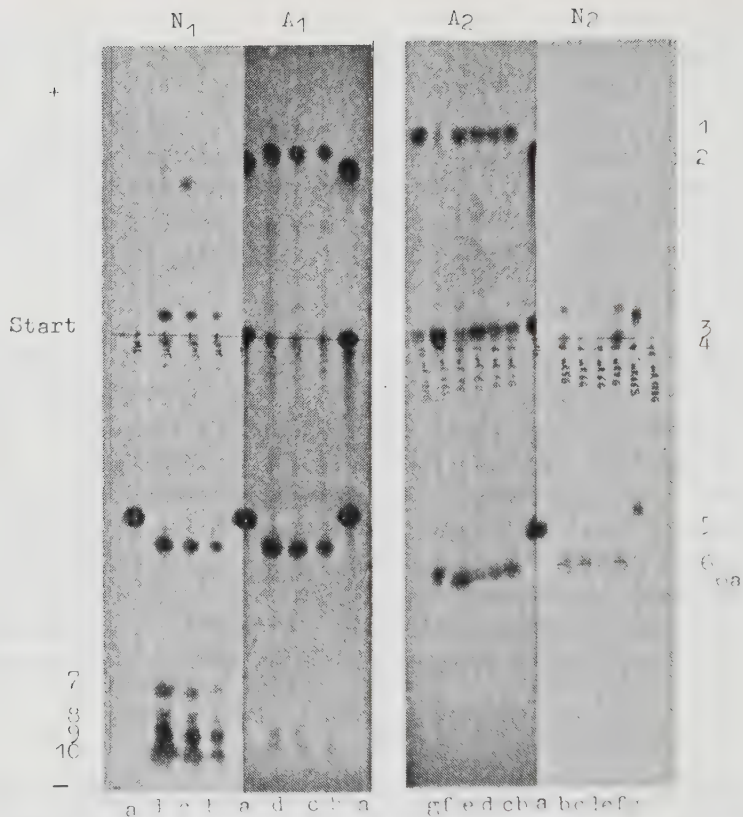


Abb. 12: Elektropherogramme von LPS-Hydrolysaten (0,5N HCl, 37°C, 24 h) zum Nachweis von 4-Aminoarabinose. N₁A₁ = Standard-LPS mR 595, b = 180 µg, c = 360 µg, d = 720 µg, N₂A₂ = zu untersuchende LPSS (875 µg), b = mR5G, c = mR6G, d = mR6G, e = mR7G, f = mR46S, g = mR128G, a = Standardzucker.

Jeweils A Teil mit Ag^+/OH^- , N Teil mit Ninhydrin gefärbt.

1 = KDO, 2 = Glc -6-phosphat (Stand. $M_{\text{KDO}} = 0,93$), 3 = Phosphoryl-äthanolamin ($M_{\text{KDO}} = 0,10$), 4 = Glucose (Stand.), 5 = GlcN, 6 = 4-Aminoarabinose ($M_{\text{GlcN}} = 1,16$), 6a = Lysin ($M_{\text{GlcN}} = 1,23$), 7 = Äthanolamin ($M_{\text{GlcN}} = 1,97$), 8 = Spermin ($M_{\text{GlcN}} = 2,1$), 9 = Kadaverin + Spermidin ($M_{\text{GlcN}} = 2,20$), 10 = Putrescin ($M_{\text{GlcN}} = 2,30$).

Tab. 3: Ergebnisse der Bestimmung von 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose (4-AraN) in den LPSS von Salmonella R-Mutanten. Die relativen Mengen (+-6+) wurden durch Vergleich mit S.minnesota R595-LPS (4+) ermittelt.

Nr.	LPS aus	4-AraN	Nr.	LPS aus	4-AraN	Nr.	LPS aus	4-AraN
1	mR 1 G	4+	8	gR 4 G	3+	41	gR 21 G	+
2	mR 1 S	4+	9	gR 5 G	7+	42	gR 22 G	+
3	mR 2 G	--	11	gR 6 G	+	43	gR 23 G	2+
4	mR 3 G	+	12	gR 7 G	5+	44	gR 24 G	2+
5	mR 5 G	2+	13	gR 7 S	4+	45	gR 25 G	+
6	mR 6 G	2+	14	gR 8 G	4+	46	gR 25 S	+
7	mR 6 G	+	16	gR 9 G	5+			
8	mR 7 G	3+	18	gR 10 G	4+	1	rR S	2+
9	mR 46 S	2+	19	gR 10 S	3+	2	rR 1 G	-
10	mR 128 G	--	20	gR 11 G	+	3	rR 1 S	-
11	mR 592 G	2+	21	gR 11 S	+	4	rR 630 G	4+
12	mR 597 G	5+	22	gR 12 G	4+	5	rR 541 G	-
13	mR 608 G	4+	23	gR 12 S	+	6	coli Re G	-
14	mR 608 S	3+	24	gR 13 G	4+			
15	mR 1000 G	6+	25	gR 14 G	4+			
16	mR 1000 S	4+	26	gR 15 S	+			
17	mR 1001A G	5+	28	gR 16 G	+			
18	mR 1001A S	5+	29	gR 17 G	2+			
19	mR 1001B G	4+	31	gR 17'S	2+			
20	mR 1001B S	4+	33	gR 18 G	3+			
			34	gR 18 G	3+			
1	gR 1 G	2+	35	gR 18 S	3+			
2	gR 1 S	4+	36	gR 19 S	+			
3	gR 2 G	3+	37	gR 19 S	2+			
4	gR 2 S	2+	38	gR 20 G	2+			
5	gR 3 G	2+	39	gR 20 S	3+			
6	gR 3 S	3+	40	gR 20 S	3+			

gewählt. Weiterhin wurde der Polyamingehalt nach Elektrodialyse der Präparate geprüft.

Die Solubilisierung der Polyamine aus den LPSS geschah durch HCl-Behandlung der LPSS und anschließende Zentrifugation. Die Amine waren im Überstand, das LPS im Sediment. Im Überstand wurden die Amine (Summe) direkt mit Dinitrofluorbenzol oder einzeln nach ihrer elektrophoretischen Trennung mit Ninhydrin (Elution der angefärbten Flecke) bestimmt.

Um eine quantitative papierelektrophoretische Trennung von Äthanolamin, Spermin, Kadaverin, Spermidin und Putrescin zu erreichen, mußten alle Proben in zwei Puffersystemen getrennt werden. Bei pH 5,4 wandern Kadaverin und Spermidin zusammen, bei pH 4,7 ist Spermidin von Äthanolamin, Kadaverin und Putrescin, die zusammen wandern, getrennt (Abb. 13). Tab. 4 enthält die Migrationswerte der verschiedenen Amine.

Tab. 4: Migrationswerte der verschiedenen Amine ($M_{\text{Spermin}} = 1$) in der Papierelektrophorese

		Migration bei	
	pH 5,4		pH 4,7
Phosphoryl- äthanolamin	(-0,027)	Phosphoryl- äthanolamin	(-0,023)
Lysin + 4-AraN	0,480	Lysin + 4-AraN	0,792
Äthanolamin	0,932	Spermin	1,000
Spermin	1,000	Spermidin	1,108
Kadaverin + Spermidin	1,060	Äthanolamin + Kadaverin + Putrescin	1,454
Putrescin	1,135		

Tab. 5 zeigt die aus der direkten Bestimmung erhaltenen und die aus der Summe der Einzelbestimmung berechneten Werte für den Gesamtgehalt an Aminen. Die Ergebnisse passen zueinander; die direkt bestimmten Werte liegen erwartungsgemäß im allgemeinen etwas höher (da sie die Lysin-Arabinosamin- und P-EtN-Werte enthalten).

Tab. 5: Total-Polyamin-Gehalt verschiedener S.minnesota R595
ED: elektrodialysiertes LPS, Werte in Klammern:
Summe P-Äthanolamin + Äthanolamin.
*) Dieses Präparat war großtechnisch bei der Firma
Beachams, England, hergestellt worden.

<u>S.minnesota</u> <u>R595-LPS</u> Präparation	Totalamine + Totalpolyamine: Gesamtbestimmung µg/mg LPS	Totalpolyamine: Summe der Einzel- bestimmungen µg/mg LPS
S 509	10,8	5,8 (1,9)
S 511	11,9	4,8 (0,8)
RK 1167 *)	30,0	3,9 (20,4)
S 494	30,8	10,8 (2,0)
S 513	24,5	9,1 (3,5)
S 224	11,0	4,5 (1,9)
ED 25	14,7	3,6 (2,9)
ED 28	10,7	2,1 (1,8)
ED S 404	2,8	0,5 (1,4)

Tab. 6 zeigt die Ergebnisse der Einzelbestimmungen. Spermin ist nur in einem der LPS-Präparate enthalten. Während Phosphoryläthanolamin in allen LPSs vorkommt, ist Äthanolamin jeweils nur in Spuren nachweisbar. Nach Elektrodialyse

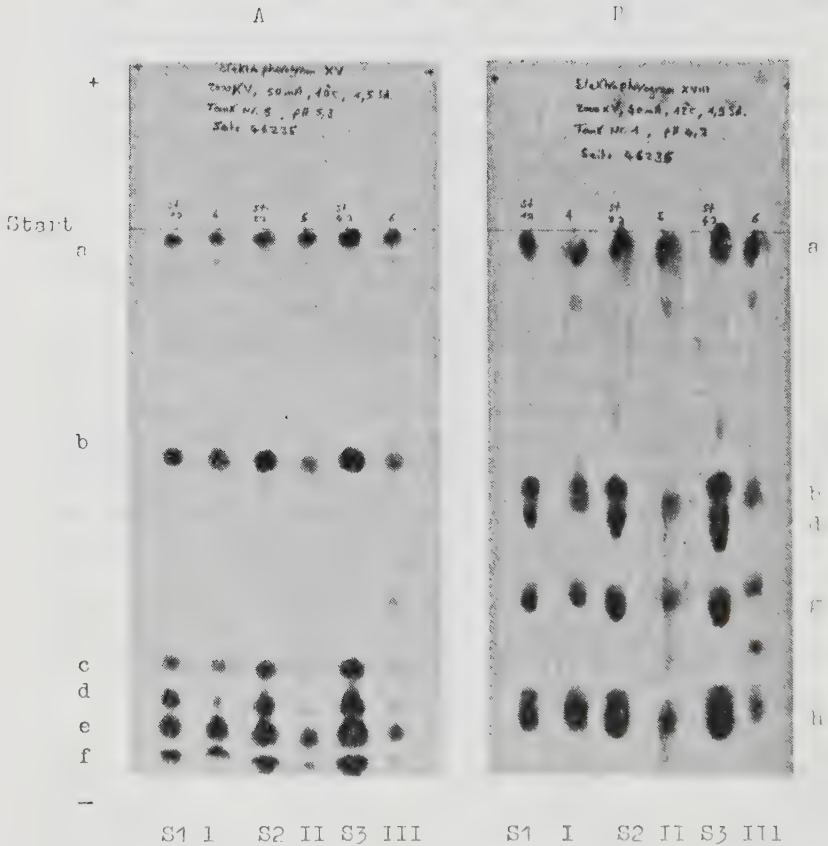


Abb. 13: Papierelektrophoretische Trennung der Amine von S. minnesota R595-LPSs.
 Die LPS wurden in 10 N HCl für 15 sec auf 100°C erhitzt, zentrifugiert und die Überstände elektrophoresiert: A bei pH 5,4; B bei pH 4,7.
 a = Phosphoryl-ethanolamin, b = Lysin/Arabinoxamin, c = Äthanolamin, d = Spermin, e = Kadaverin/Spermidin, f = Putrescin, g = Spermidin, h = Äthanolamin/Kadaverin/Putrescin.
 S1, S2 und S3 = 1,2 und 4 µl 0,01 M Amingemisch (Standard, enthaltend a, c, d, e, f und Lysin).
 I, II und III = Präparationen S. minnesota R595 S494, ED25 und ED28 (je ca. 0,55 mg).

ist der Gehalt an Polyaminen wesentlich erniedrigt, während die Phosphoryläthanolaminwerte fast unverändert hoch sind. Es wird angenommen, daß P-EtN in LPSS nur in gebundener Form vorkommt und unter den sauren Bedingungen der Isolierung der Polyamine freigesetzt wird. Äthanolamin entsteht wahrscheinlich aus P-EtN. Schließlich zeigt die Tabelle, daß von Präparat zu Präparat der Polyamingehalt sehr unterschiedlich ist. Es erschien daher nicht lohnend, Aminbestimmungen an den in dieser Arbeit untersuchten LPSS durchzuführen.

Tab. 6: Ergebnis der Bestimmung der Amine im LPS
ED: elektrodialysiertes LPS

<u>S.minnesota</u> R595-LPS Präparation	Spermin	Spermidin	Putrescin	Kadaverin	Phosphoryl- äthanol- amin	Äthanol- amin
	µg/mg LPS					
S 595	0,0	4,4	0,5	0,9	1,6	0,3
S 511	0,0	3,8	0,5	0,5	0,5	0,3
RK 1167	0,0	0,5	2,0	1,4	20,3	0,1
S 494	0,0	3,9	1,1	5,8	1,7	0,3
S 513	0,8	1,0	1,7	5,6	3,2	0,3
S 224	0,0	3,7	0,6	0,2	1,4	0,5
ED 25	0,0	3,6	0,0	0,0	2,9	0,0
ED 28	0,0	2,1	0,0	0,0	1,8	0,0
ED S 404	0,0	0,5	0,0	0,0	1,4	0,0

2.1.7 Fettsäuren:

Die Hydroxyl- und Aminofunktionen des Glucosamin-Disaccharids von Lipoid A sind mit langkettigen Fettsäuren besetzt, und zwar die Aminogruppen mit D-3-Hydroxymyristinsäure, und die OH-Gruppen mit Laurinsäure (C12), Palmitinsäure (C16) und D-3-Hydroxymyristinsäure (3-OH-C14), die ihrerseits mit Myristinsäure (C14) besetzt ist. (Die in letzter Zeit identifizierte L-2-Hydroxymyristinsäure kann auf der benutzten Säule nicht nachgewiesen werden, da sie mit Palmitinsäure zusammenfällt). Tab. 7 zeigt die Ergebnisse der Fettsäurebestimmungen, die gaschromatographisch als Methylester bestimmt wurden.

2.2 Serologische Analyse der Lipopolysaccharide:

2.2.1 Hämagglutination:

Die zu testenden LPSs aus den R-Mutanten von S.minnesota (mR), S.godesberg (gR) und S.ruiru (rR) wurden in 0,9% NaCl-Lösung im Wasserbad erhitzt und an menschliche Erythrozyten fixiert. Die sensibilisierten Erythrozyten wurden dann hinsichtlich ihrer Agglutinierbarkeit mit Testseren geprüft. Die benutzten Antiseren waren mit bekannten Salmonella R-Formen, Ra-Re (s. Abb. 8), durch Immunisierung von Kaninchen und anschließender Absorption erhalten worden (Ruschmann und Niebuhr, 1972). Die folgende Tabelle 8 faßt die Ergebnisse zusammen. Wiedergegeben sind jeweils diejenigen Antiserum-Titer, die gerade noch eine Hämagglutination ergaben. Hohe Titer (unterstrichen) zeigen relativ starke Kreuzreaktionen an und geben einen Hinweis auf den Chemotyp des entsprechenden LPS.

Tab. 7: Ergebnisse der Fettsäure-Analyse (gaschromatographisch).
Die Fettsäuren wurden mit 4 N NaOH freigesetzt und mit Diazomethan verestert. Δ^2C14 ist ein Kunstprodukt, welches aus 3-Myristoxy-myristinsäureester durch β -Eliminierung entsteht (Rietschel et al., 1972). Bezeichnungen der Präparate, s.Tab.1.

Tab.7a Nr.	LPS aus	Laurins. (C12) %	Myristins. (C14) %	α - β -unges. Myristins. (Δ^2C14) %	Palmitins. (C16) %	β -Hydroxy- Myristins. (3-OH-C14) %
1	mR 1 G	5,4	5,2	3,5	5,7	9,5
2	mR 1 S	2,9	4,2	3,2	5,1	8,4
3	mR 2 G	4,4	4,0	3,2	5,1	9,4
4	mR 3 G	5,4	6,1	3,6	5,5	11,8
5	mR 5 G	12,1	8,9	5,1	6,8	15,4
6	mR 6 G	7,0	7,6	3,8	4,9	15,2
7	mR 6 G	6,0	5,9	3,3	4,1	10,6
8	mR 7 G	7,9	6,2	4,0	7,6	15,0
9	mR 46 S	1,4	2,6	2,3	4,3	4,8
10	mR 128 G	8,4	7,2	5,0	2,7	15,0
11	mR 592 G	6,7	6,6	3,3	4,5	11,2
12	mR 597 G	7,4	5,8	4,9	6,9	16,3
13	mR 608 G	3,2	5,5	2,5	5,7	8,9
14	mR 608 S	3,6	3,5	2,9	4,9	4,9
15	mR 1000 G	8,5	6,2	5,0	8,0	14,9
16	mR 1000 S	2,3	2,4	2,3	4,5	4,8
17	mR 1001A G	6,6	7,2	5,7	8,1	17,8
18	mR 1001A S	7,1	5,4	3,0	6,3	14,2
19	mR 1001B G	1,6	4,3	2,6	5,8	8,0
20	mR 1001B S	2,3	4,1	2,7	5,3	8,6

Tab.7b Nr.	IPS aus	Laurins. (C12) %	Myristins. (C14) %	α - β -unges. Myristins. (Δ^2 C14) %	Palmitins. (C16) %	β -Hydroxy- Myristins. (3-OH-C14) %
1	gR 1 G	1,8	4,1	2,4	3,3	6,2
2	gR 1 S	3,1	4,3	2,4	1,8	8,3
3	gR 2 G	6,9	7,7	5,4	5,8	16,6
4	gR 2 S	4,8	5,8	3,8	3,8	11,8
5	gR 3 G	5,9	6,6	4,2	3,8	13,3
6	gR 3 S	6,2	7,6	4,0	3,9	14,2
7	gR 3 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
8	gR 4 G	6,4	6,3	3,9	5,5	16,2
9	gR 5 G	7,0	8,8	5,2	6,4	17,3
10	gR 5 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
11	gR 6 G	2,8	2,5	1,7	2,3	6,7
12	gR 7 G	5,8	9,0	5,3	6,5	18,8
13	gR 7 S	2,4	4,0	2,1	2,8	6,6
14	gR 8 G	4,3	4,3	2,6	2,6	10,9
15	gR 8 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
16	gR 9 G	6,5	7,1	4,9	5,5	13,1
17	gR 9 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
18	gR 10 G	5,4	4,7	3,4	4,6	12,8
19	gR 10 S	4,8	6,3	3,7	3,6	11,7
20	gR 11 G	5,5	6,3	3,4	5,6	11,8
21	gR 11 S	4,7	6,1	3,8	4,0	10,8
22	gR 12 G	5,0	6,0	3,6	6,0	13,4
23	gR 12 S	4,2	5,8	3,7	3,6	10,7
24	gR 13 G	5,3	5,8	3,3	4,6	13,2
25	gR 14 G	3,7	4,5	2,9	4,3	10,6
26	gR 15 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
27	gR 15 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
28	gR 16 G	5,2	4,2	2,5	2,9	10,9
29	gR 17 G	1,6	1,9	1,9	1,7	4,6
30	gR 17'G	5,1	4,3	3,1	3,4	9,8
31	gR 17'S	3,1	2,7	2,4	2,5	7,6
32	gR 17 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

Tab.7b	LPS aus	Laurins.	Myristins.	α - β -unges. Myristins.	Palmitins.	β -Hydroxy- Myristins.
		(C12) %	(C14) %	(Δ^2 C14) %	(C16) %	(3-OH-C14) %
33	gR 18 G	3,9	2,5	1,7	3,2	8,7
34	gR 18 G	3,6	3,6	2,7	4,3	9,2
35	gR 18 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
36	gR 19 S	0,8	1,5	1,1	1,5	2,6
37	gR 19 S	2,7	3,5	2,0	2,0	6,2
38	gR 20 G	2,6	2,8	1,5	1,8	6,4
39	gR 20 S	3,2	4,0	2,3	1,9	5,7
40	gR 20 S	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
41	gR 21 G	12,1	6,0	3,7	4,5	13,8
42	gR 22 G	1,8	1,4	1,2	1,5	4,1
43	gR 23 G	2,0	2,0	1,4	1,5	4,6
44	gR 24 G	2,7	2,5	1,6	1,9	5,7
45	gR 25 G	3,0	2,1	2,2	2,0	5,6
46	gR 25 S	2,3	2,3	1,6	1,7	5,0

Tab.7C	LPS	Laurins.	Myristins.	α - β -unges. Myristins.	Palmitins.	β -Hydroxy- Myristins.
		(C12) %	(C14) %	(Δ^2 C14) %	(C16) %	(3-OH-C14) %
1	rR S	0,9	1,0	0,7	1,4	2,2
2	rR 1 G	3,6	2,6	1,5	0,6	4,7
3	rR 1 S	1,9	1,4	1,0	0,4	3,8
4	rR 630 G	1,8	1,8	1,5	1,9	4,8
5	rR 541 G	2,0	1,7	1,1	0,7	4,2
6	coli Re G	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
7	coli Re 7515 G	2,8	3,1	1,8	3,3	8

Tab. 8b:	LPS aus	Antiserum gegen					Hämagglutinations-Titer		
		Ra S. typhi. his-Mutante	Rb ₁ S. minn. R345	Rcp ⁺ S. typh. M	Rcp ⁻ S. minn. R5	Rd ₁ p ⁺ S. minn. R21	Rd ₁ p ⁻ S. minn. R7	Rd ₂ S. minn. R4	Re S. minn. R595

1	gR 1 G	20	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
2	gR 1 S	160	Ø	320	-	80	-	-	-
3	gR 2 G	1280	Ø	10	-	Ø	-	-	-
4	gR 2 S	160	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
5	gR 3 G	-	Ø	Ø	Ø	80	40	40	Ø
6	gR 3 S	1280	Ø	320	Ø	40	40	40	Ø
11	gR 6 G	1280	Ø	10	-	Ø	-	-	-
15	gR 8 S	-	Ø	320	20	80	20	20	40
26	gR 15 S	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20
27	gR 15 S	20	Ø	320	-	40	80	80	320
29	gR 17 G	320	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
30	gR 17' G	20	Ø	Ø	-	Ø	-	40	5120
31	gR 17' S	160	Ø	640	Ø	80	-	-	-
32	gR 17 S	Ø	20	160	-	80	-	-	-
36	gR 19 S	40	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
37	gR 19 S	80	Ø	320	-	160	-	-	-
38	gR 20 G	-	Ø	Ø	Ø	40	20	Ø	Ø
39	gR 20 S	Ø	Ø	320	Ø	Ø	-	-	-

Antiserum gegen

Tab. 8b	LPS	Ra	Rb ₁	RcP ⁺	RcP ⁻	Rd ₁ P ⁺	Rd ₁ P ⁻	Rd ₂	Re
Nr.	aus	S. typhi his-Mutante	S. minn. R345	S. typh. M	S. minn. R5	S. minn. R7	S. minn. R4	S. minn. R595	
Hämmagglutinations-Titer									
40	gR 20 S	40	Ø	640	-	160	-	-	-
41	gR 21 G	Ø	Ø	Ø	20	640	40	320	Ø
42	gR 22 G	<u>1280</u>	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
43	gR 23 G	<u>640</u>	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
44	gR 24 G	-	Ø	Ø	20	Ø	Ø	Ø	Ø
45	gR 25 G	-	Ø	20	20	160	80	Ø	Ø
46	gR 25 S	Ø	20	<u>640</u>	-	160	-	-	-

Tab. 8c LPS
Nr. aus

1	rR S	20	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-
2	rR 1 G	-	Ø	80	640	40	160	20	Ø
3	rR 1 S	-	Ø	<u>320</u>	80	80	<u>160</u>	40	Ø
4	rR 630 G	-	Ø	Ø	Ø	Ø	40	160	Ø
5	rR 541 G	-	Ø	Ø	40	20	Ø	Ø	Ø

2.2.2 Hämagglutinations-Hemmung:

Die aufgrund der chemischen Analyse als Re (hexose- und heptoselos) identifizierten LPSs wurden getestet, inwieweit sie mit einem Re-Standard LPS kreuzreagieren. Die LPSs wurden in fallenden Konzentrationen mit Re-Antiserum inkubiert und die minimale Menge LPS ermittelt, die die Reaktion des Antiserums mit Re-LPS-sensibilisierten Erythrozyten gerade noch verhindert. Tab. 9 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 9: Ergebnis der passiven Hämagglutinations-Hemmung im Re/anti Re-System. Getestet wurden LPSs, die aufgrund der chemischen Analyse als Re identifiziert waren. Die höchste getestete LPS-Menge war 500 µg/ml.

Nr.	LPS aus	Kleinste, zur Hemmung der Hämagglutination (Re/anti Re) benötigte LPS-Menge (µg)
8	gR 4 G	1,9
9	gR 5 G	31,2
12	gR 7 G	3,9
13	gR 7 S	125
14	gR 8 G	0,9
16	gR 9 G	15,6
18	gR 10 G	3,9
19	gR 10 S	62,5
20	gR 11 G	3,9
21	gR 11 S	15,6
22	gR 12 G	15,6
23	gR 12 S	15,6
24	gR 13 G	3,9
25	gR 14 G	7,8
26	gR 15 S	250
27	gR 15 S	15,6
28	gR 16 G	1,9
33	gR 18 G	1,9
34	gR 18 G	1,9
35	gR 18 S	7,8
7	coli Re G	7,8

2.3 Reaktion der R-Form-LPSs mit Komplement:

Im allgemeinen führt die Inkubation von LPSs mit Komplement zu einer Erniedrigung der hämolytischen Aktivität des Komplements. Es ist gezeigt worden, daß LPSs diese Wirkung nur entfalten, wenn sie in hochaggregierter Form vorliegen. LPSs vom Chemo-
typ Ra und Rb, soweit geprüft, inaktivieren Komplement nicht (siehe Einleitung).

Es wurde geprüft, inwieweit die in dieser Arbeit untersuchten R-LPSs mit C' reagieren. Es wurden jeweils zwei LPS-Mengen getestet (14 und 24 µg), die erfahrungsgemäß optimal wirksam sind. Tab. 10 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Nur etwa 10 der untersuchten LPSs inaktivieren C' zu 80-100%, die übrigen sind wenig wirksam. Es erschien wahrscheinlich, daß zumindest bei einem Teil der Präparate die Schwerlöslichkeit im Wasser die Ursache für die Unwirksamkeit war. Es wurden daher eine Reihe von Re-LPSs nach Elektrodialyse in die Na-Salzform überführt. Wie Tab. 10 zeigt, sind diese Präparate nun hochaktiv. In Abb. 14 sind einige LPS-Aktivitätskurven aufgezeichnet.

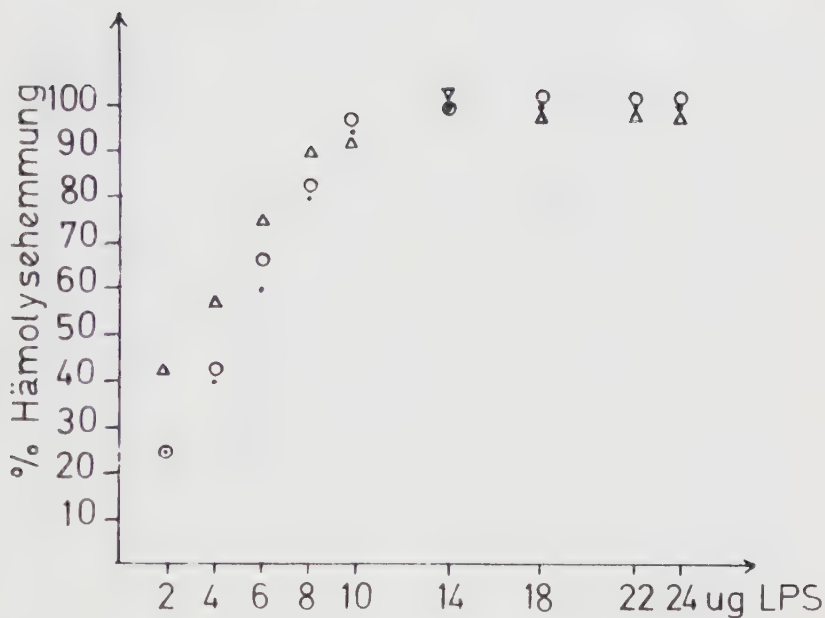


Abb. 14: Komplement-Aktivität von LPS-Na-Salzen: S. minn. mR1000 G (·) ,
S. minn. mR1001A G (o) und S. godesberg gr5G (Δ) als Beispiele.

Tab. 10: Antikomplementäre Aktivität von *Salmonella* (R-Form)-LPS.
 In einigen Fällen wurden außer den Original-LPSs auch die Na-Salze von LPSs getestet (in Klammern), die nach Elektrodialyse und Neutralisation mit NaOH erhalten worden waren.

Nr.	LPS aus	% Hämolysehemmung LPS		Nr.	LPS aus	% Hämolysehemmung LPS	
		Original 14 µg	(Na-Form) 24 µg			Original 14 µg	(Na-Form) 24 µg
1	mR 1 G	33 (27)	41 (40)	7	gR 3 S	00	00
2	mR 1 S	43 (45)	48 (50)	8	gR 4 G	19	50
3	mR 2 G	12	13	9	gR 5 G	20 (99)	50 (100)
4	mR 3 G	51 (51)	49 (52)	10	gR 5 S	00	00
5	mR 5 G	44	49	11	gR 6 G	10 (5)	10 (8)
6	mR 6 G	69	63	12	gR 7 G	70	100
7	mR 6 G	25	36	13	gR 7 S	20 (49)	17 (72)
8	mR 7 G	50	48	14	gR 8 G	13	34
9	mR 46 S	47	89	15	gR 8 S	11	21
10	mR 128 G	37	33	16	gR 9 G	28	100
11	mR 592 G	30	31	17	gR 9 S	00	00
12	mR 597 G	23	31	18	gR 10 G	29	99
13	mR 608 G	19	27	19	gR 10 S	00 (99)	6 (100)
14	mR 608 S	53	45	20	gR 11 G	87	100
15	mR 1000 G	26 (98)	40 (99)	21	gR 11 S	2 (100)	9 (100)
16	mR 1000 S	85	80	22	gR 12 G	51 (70)	67 (99)
17	mR 1001A G	21 (99)	57 (100)	23	gR 12 S	12	20
18	mR 1001A S	00	17	24	gR 13 G	38 (95)	71 (100)
19	mR 1001B G	23	30	25	gR 14 G	75	97
20	mR 1001B S	29	41	26	gR 15 S	5 (0)	38 (5)
				27	gR 15 S	18	27
1	gR 1 G	20	30	28	gR 16 G	54	91
2	gR 1 S	00	00	29	gR 17 G	(7) (5)	18 (18)
3	gR 2 G	41 (41)	57 (48)	30	gR 17'G	80	100
4	gR 2 S	5 (5)	9 (10)	31	gR 17'S	52	60
5	gR 3 G	36 (36)	39 (39)	32	gR 17 S	5	5
6	gR 3 S	36	48	33	gR 18 G	58	96

Nr.	LPS aus	% Hämolysehemmung LPS		Nr.	LPS aus	% Hämolysehemmung LPS	
		Original 14 µg	(Na-Form) 24 µg			Original 14 µg	(Na-Form) 24 µg
34	gR 18 G	90	100	1	rR S	85	93
35	gR 18 S	17 (95)	26 (100)	2	rR 1 G	48	53
36	gR 19 S	57	54	3	rR 1 S	40	44
37	gR 19 S	56	36	4	rR 630 G	59	54
38	gR 20 G	26	28	5	rR 541 G	40	48
39	gR 20 S	13	10	6	coli Re G	23	42
40	gR 20 S	49	56	7	coli Re 7515 G	29 (99)	81 (100)
41	gR 21 G	31	22				
42	gR 22 G	36 (39)	48 (48)				
43	gR 23 G	17 (15)	10 (10)				
44	gR 24 G	44 (43)	40 (30)				
45	gR 25 G	40 (39)	31 (29)				
46	gR 25 S	62 (44)	66 (50)				

3. DISKUSSION

3.1 Grundlage der vorliegenden Arbeit sind Lipopolysaccharide und chemische Analysen. Daher soll zunächst einiges Grundsätzliches hierzu gesagt werden.

3.1.1 LPSs: Die untersuchten Bakterien wurden routinemäßig gezüchtet (Dr. S. Schlecht, MPI Freiburg) und routinemäßig entweder mit Phenol/Wasser (P/W) (S-Präparate) oder Phenol/Chloroform/Petroläther (PCP) (G-Präparate) extrahiert und durch Ultrazentrifugation gereinigt. Alle Verfahren waren standardisiert. Trotzdem kann die Qualität verschiedener LPS-Präparationen aus der gleichen Mutante in gewissen Grenzen Schwankungen unterliegen. So kann die Phosphatmenge schwanken (Nukleinsäure Verunreinigungen), der Substitutionsgrad der Heptose mit Phosphat kann verschieden sein, wodurch sich die gaschromatographisch bestimmte Heptose-Menge ändert, die Anwesenheit von Glucanen kann verschieden sein und damit die Glucose-Werte. Im großen und ganzen war bislang die Erfahrung (unveröffentl.), daß verschiedene Präparationen aus der gleichen Mutante identisches LPS liefern. Mit anderen Worten, wenn eine Mutante revertrierte oder eine Doppelmutante partiell revertrierte, oder wenn ein neuer LPS-Defekt entstand, so war dies bei der LPS-Analyse in jedem Fall erkennbar.

3.1.2 Chemische Analysen: Die angewandten Analysemethoden sind reproduzierbar. Wird das gleiche LPS mehrmals analysiert, so schwanken die Werte erfahrungsgemäß nicht mehr als $\pm 5\%$. Das heißt nicht, daß die erhaltenen Werte "richtig" sind. Bei vielen Bestimmungen stellen die Hydrolysebedingungen einen Kompromiß dar: unter zu milden Bedingungen ist die Hydrolyse unvollständig, zu drastische Hydrolyse zerstört empfindliche Komponenten. Besonders anfällig sind die KDO- und Heptose-Bestimmungen. Die KDO-Bestimmung beruht (a) auf der leichten

Hydrolysierbarkeit der KDO-Bindung und (b) auf der Bildung von Formylpyruvat nach Perjodatoxydation, wobei die 4. und 5.Stellung des KDO frei sein müssen (Heath, 1971). Es liegen keine Untersuchungen darüber vor, ob beide Bedingungen immer erfüllt sind. - Heptose liegt teilweise als Phosphat vor, das hydrolytisch schwer gespalten wird. Das Vorliegen von freier Heptose ist jedoch eine Voraussetzung für die gaschromatographische Bestimmung. Im allgemeinen sind daher die kolorimetrischen Heptose-Werte höher als die gaschromatographisch bestimmten.

Darüberhinaus kann man davon ausgehen, daß alle Analysenergebnisse Minimalwerte darstellen. Dies mag ein Grund dafür sein, daß die Summe der analysierten Komponenten bei keinem LPS 100% erreicht. Die meisten Werte liegen zwischen 70 und 90% (Tab. 11). Ein weiterer Grund für die niedrigen Summenwerte ergibt sich daraus, daß einzelne Komponenten nicht berücksichtigt wurden, wie Polyamine, Metall-Kationen, 4-Aminoarabinose und Äthanolamin. Sicher enthalten manche LPSs auch Verunreinigungen an Nukleinsäuren und Proteinen. Die hier erhaltenen Ergebnisse stimmen im Prinzip jedoch überein mit früheren an analogen LPSs ausgeführten Analysen (Lüderitz et al., 1966).

Wie in der Einführung erwähnt, enthalten die Phenol/Wasser-extrahierten Präparate (im Gegensatz zu den PCP-extrahierten) oft außer R-LPS auch S-Form LPS. Dies bedingt die verschiedenen Analysenergebnisse bei S- und G-Präparaten (Galanos et al., 1969).

In Tab. 11 sind die wichtigsten Analysenergebnisse zusammengefaßt. Berücksichtigt wurden im allgemeinen die G-Präparate, da sie das R-LPS in reiner Form enthalten. Alle Werte sind in Mol ausgedrückt und bezogen auf 2 Mole Glucosamin, d.h. auf eine Lipoid A-Einheit. Diese Werte sind irreführend, wenn es sich um S-Form LPSs oder um Mischungen von S- und R-LPSs han-

Tab. 11: Zusammenfassung der Analyseergebnisse an R-LPSs.

Aufgeführt sind die für die jeweiligen Mutanten charakteristischen LPS-Präparate (meist G-Präparate). Mit *) bezeichnete LPSs enthalten O-spezifischen Zucker. Die Chemotyp-Zuordnung ist provisorisch. Die unterstrichenen Chemotypen werden in den Kapiteln 3.4.1 bis 3.4.6 besprochen, die Zuordnung der nicht unterstrichenen ist unsicher. - Die Werte für 3-OH-C14 enthalten die für Δ^2 C14 ermittelten (Tab.7).

Nr.	LPS aus	R Chemotyp	Zucker				KDO	Fettsäuren			Summe Bau- steine (% LPS)
			Phos- phor	Gal	Glc	Hep		Summe C12C14C16	3-OH-C14	Summe Fetts.	
1	mR 1 G	<u>Rb</u>	2,9	0,9	0,6	1,9	1,5	2,5	1,9	4,4	72,24
3	mR 2 G	<u>Ra</u>	6,8	2,4	1,4	5,7	1,4	2,7	2,6	5,3	83,10
4	mR 3 G	<u>Ra</u>	4,5	1,7	1,5	3,4	1,9	3,5	3,3	6,8	77,05
5	mR 5 G	<u>RcP⁻</u>	3,2	0,5	1,4	2,4	1,6	5,9	4,0	9,9	84,91
6	mR 6 G	<u>RcP⁻</u>	2,7	0,4	1,2	2,4	1,6	4,0	3,6	7,6	74,37
8	mR 7 G	<u>Rd₁P⁻</u>	3,0	0,0	0,0	2,7	1,9	4,2	3,5	7,7	74,32
9	mR 46 S *)	S	1,3	1,9	0,7	1,0	0,3	0,6	0,6	1,3	73,39
10	mR 128 G	<u>Rd₁P⁻</u>	2,3	0,0	0,0	3,8	2,1	4,2	4,1	8,3	74,25
11	mR 592 G	<u>RcP</u>	1,7	0,3	1,0	1,6	1,0	2,3	2,0	4,3	74,50
12	mR 597 G	<u>Rd₂</u>	3,3	0,0	0,0	1,9	2,4	4,6	4,5	9,1	70,43
13	mR 608 G	?/Rd	2,9	0,8	0,6	2,5	1,0	2,0	1,5	3,5	73,35
15	mR 1000 G	<u>Rd₂</u>	2,3	0,0	0,1	0,9	1,1	2,8	2,3	5,1	75,39
17	mR 1001A G	<u>Re</u>	2,8	0,0	0,0	0,2	1,8	3,3	3,1	6,4	72,73
19	mR 1001B S	<u>Rd₂</u>	1,5	0,2	0,2	1,0	1,0	1,1	1,2	2,3	55,99

Nr.	LPS aus	R Chemotyp	Zucker			KDO	Fettsäuren		Summe Bau- steine (% LPS)
			Phos- phor	Gal	Glc	Hep	Summe C12C14C16	3-OH-C14	
			Mol pro 2 Mole				GlcN		
2	gr 1 S *)	S	2,8	2,0	2,9	4,0	1,1	1,8	89,39
3	gr 2 G	<u>Ra</u>	2,8	0,5	0,6	0,9	1,6	2,8	86,80
5	gr 3 G	<u>Rd, P⁺</u>	3,5	0,4	0,4	2,8	1,1	2,5	90,04
8	gr 4 G	<u>Re</u>	2,6	0,0	0,0	0,0	2,3	2,6	69,42
9	gr 5 G	<u>Re</u>	1,3	0,1	0,1	0,0	1,9	2,5	78,73
11	gr 6 G	<u>Ra</u>	6,7	2,3	4,1	5,0	1,7	2,0	82,67
12	gr 7 G	<u>Re</u>	2,7	0,0	0,1	0,0	1,9	2,8	77,87
14	gr 8 G	<u>Re</u>	3,5	0,0	0,1	0,0	2,5	1,9	55,55
16	gr 9 G	<u>Re</u>	3,5	0,1	0,4	0,1	3,3	3,4	70,62
18	gr 10 G	<u>Re</u>	2,6	0,0	0,0	0,0	2,0	1,8	65,43
20	gr 11 G	<u>Re</u>	3,4	0,0	0,0	0,0	2,4	2,8	62,43
22	gr 12 G	<u>Re</u>	3,4	0,0	0,0	0,2	2,3	2,7	64,92
24	gr 13 G	<u>Re</u>	3,2	0,0	0,0	0,0	2,7	2,2	65,37
25	gr 14 G	<u>Re</u>	3,0	0,0	0,0	0,1	2,4	1,9	58,04
27	gr 15 S	<u>Rc/Re</u>	1,7	0,3	1,1	0,3	1,7	n.g.	n.g.
28	gr 16 G	<u>Re</u>	3,2	0,0	0,1	0,2	2,8	2,0	60,42
29	gr 17 G	<u>Ra</u>	8,7	1,7	3,6	5,4	1,9	1,6	73,44
30	gr 17' G	<u>Re</u>	3,5	0,1	0,3	0,4	2,4	2,1	60,84

Nr.	LPS aus	R Chemotyp	Phos- phor	Zucker			KDO	Fettsäuren		Summe Bau- steine (% LPS)
				Gal	Glc	Hep		Summe C12C14C16	3-OH-C14	
Mol. pro 2 Mole GlcN										
34	gR 18 G	<u>Re</u>	3,0	0,0	0,0	0,1	2,5	1,7	1,7	55,52
37	gR 19 S *)	S	7,0	2,4	9,3	5,1	1,4	3,3	3,0	74,13
38	gR 20 G	<u>Rd₁P⁺</u>	4,0	0,0	0,1	3,3	1,4	1,5	1,6	59,88
41	gR 21 G	<u>Rd₁P⁺</u>	6,0	0,0	0,2	2,6	1,7	4,9	3,4	85,72
42	gR 22 G	<u>Ra/Rc</u>	7,7	0,2	2,0	2,5	2,1	1,1	1,2	60,62
43	gR 23 G	<u>Ra</u>	7,7	1,9	2,6	2,9	1,7	1,3	1,1	68,37
44	gR 24 G	<u>Ra/Rd</u>	4,1	0,6	0,8	3,4	1,9	1,7	1,6	64,69
45	gR 25 G	<u>Rb</u>	6,7	0,6	0,9	2,9	1,8	2,0	1,8	61,16

Nr.	LPS aus									
1	rR S *)	S	1,4	1,6	0,9	1,0	0,3	0,3	0,2	63,49
2	rR 1 G	<u>Rb/Rc</u>	2,9	0,2	0,6	3,5	1,7	1,4	1,1	53,04
4	rR 630 G	<u>Rd₂</u>	3,1	0,0	0,1	1,6	2,4	1,2	1,2	42,14
5	rR 541 G	<u>Rb/Rc</u>	4,0	0,2	0,4	3,3	1,4	0,8	0,8	55,93
6	coli Re G	<u>Re</u>	2,4	0,0	0,0	0,0	2,0	n.g.	n.g.	n.g.

delt, weil die O-spezifischen Ketten Glucosamin und Galaktosamin (das in der Morgan-Elson-Bestimmung auch erfaßt wird) enthalten. In diesen Fällen sind die molaren Werte für die Kernzucker (Tab. 11) wesentlich zu niedrig.

Die Summe der LPS-Komponenten ist in der Tab. 11 in % (bezogen auf LPS) angegeben. Außerdem sind die LPS jeweils demjenigen Chemotyp zugeordnet worden, der sich als der wahrscheinlichste aus den chemischen und serologischen Analysenergebnissen ergibt (siehe unten). Diese Klassifikation hat jedoch nur einen vorläufigen Wert und ist nicht endgültig. LPS-Ausbeuten sind in Tab. 1 enthalten.

3.2 Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten R-Mutanten stammten von Dr. J. Schlosshardt, Institut für Serum- und Impfstoffprüfung, Berlin-Pankow (jetzt Potsdam), die sie 1963 aus den Wildstämmen von S. minnesota, S. ruiuru und S. godesberg isoliert hatte. Zwei E. coli Re Mutanten stammen von Dr. M. Bayer, Philadelphia, der sie als phagenresistente Mutanten isoliert hatte. Sie waren bereits früher als Re Mutanten erkannt worden (Bayer und Anderson, 1965).

S. minnesota und S. ruiuru gehören beide zur Salmonella Gruppe L des Kauffmann-White-Schemas und besitzen den O-Faktor 21. S. godesberg gehört zur Gruppe N und besitzt den O-Faktor 30 (Kauffmann, 1961).

Abb. 15: S. minnesota, S. ruiuru, S. godesberg: Struktur der O-spezifischen Ketten

Spezies	O-Gruppe	O-Faktor	O-spezifische Kette	
<u>S. minnesota</u> <u>S. ruiuru</u>	L	21	Gal ↓ α -Gal-B1,3-GalNAc-1,3-GalNAc-	GlcNAc ↓ α -GlcNAc-1,3-GalNAc-
<u>S. godesberg</u>	N	30	Glc ↓ $1,4$ -Glc-B1,3-GalNAc-Fuc-	

Die Strukturen der O-spezifischen Ketten dieser Salmonella Spezies sind bekannt und in Abb. 15 wiedergegeben (Lüderitz et al., 1968). Die O-spezifischen Ketten von S.minnesota und S.ruiru sind durch sich wiederholende Oligosaccharid-Einheiten charakterisiert, die Galaktose, Glucosamin und Galaktosamin enthalten. Die Wiederholungseinheiten von S.godesberg enthalten Glucose, Fucose und Galaktosamin. Spezifische O-Kettenzucker, die weder im Kern noch in Lipoid A vorkommen, sind daher GalN bzw. GalN und Fuc. Diejenigen der untersuchten LPSs, die diese Zucker enthalten, wären damit als S-Form-LPS oder S-Form-LPS-ähnlich erkannt. Entsprechend stammen alle LPSs, die diese Zucker nicht enthalten, aus R-Mutanten. Die Charakterisierung dieser R-Form-LPSs war ein Ziel dieser Arbeit. Daß man mit den vorliegenden Untersuchungen diesem Ziel nur näher kommen würde, war von vornherein klar. Zur Erkennung der Struktur eines (R-) LPS ist zwar die Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung wichtig, aber Strukturanalysen sind unerlässlich (Methylierungsanalysen, Analysen von Abbau- und Spaltprodukten jeweils nach Fraktionierung und Reinigung). Auf den ersten Blick erscheinen zwar die LPS-Formeln Ra-Re (Abb. 8) durch die Quantität der Bausteine hinreichend charakterisiert. Daß dies nicht immer der Fall ist, ergibt sich aus dem folgenden.

3.2.1 Die Mikroheterogenität der LPSs: Die Struktur der zentralen Oligosaccharid-Kette des Salmonella Kerns ist festgelegt durch die Spezifität der Transferasen, die einen Zucker nach dem anderen übertragen, einschließlich der Galaktose-Seitenkette (Osborn und Rothfield, 1971). Soweit ist daher eine einheitliche Kernstruktur garantiert. Im Gegensatz dazu werden die Substituenten der Kette, wie Phosphat, Phosphoryl-äthanolamin, Pyrophosphoryl-äthanolamin und die dritte Heptose in nicht äquimolarer Menge übertragen. Auch die Substituenten an Lipoid A, wie 4-Aminoarabinose und Phosphoryl-äthanolamin, sind nicht äquimolar vorhanden. Es wird angenommen, daß der Substitutionsgrad für all diese "Verzierungen" von Züchtungs-

bedingungen abhängt, und daß die Transferreaktionen reversibel sind.

Eine bislang bekannte Ausnahme betrifft die Phosphatgruppe an Heptose I, von deren Anwesenheit die Komplettierung der Hexose-Kette abhängt. Auf diese Phosphatgruppe bezieht sich die Bezeichnung P^+ (bzw. P^- bei Abwesenheit) (Lüderitz et al., 1971). Um daher zwischen P^+ - und P^- -LPSS (Abb. 8) differenzieren zu können, müßten Kern (oder Kernfragment) und Lipoid A getrennt und der Substitutionsgrad der Heptose I mit Phosphat ermittelt werden. Die Bestimmung des Gesamt-P-Gehaltes im LPS reicht für eine Differenzierung nicht aus (siehe unten).

3.2.2 Unvollständige ("leaky") Mutationen: Besitzt eine Mutante einen LPS-Biosynthesedefekt, der komplett ist, so wird ein einheitliches R-LPS synthetisiert. Spontan-Mutanten haben jedoch oft einen inkompletten Defekt, d.h., das betroffene Enzym entfaltet noch eine Restaktivität und das Produkt wird weiter synthetisiert, jedoch nur in geringer Menge. Solche Mutanten synthetisieren zwei LPSS, das entsprechende R-LPS und eine größere oder kleinere Menge S-Form-LPS. Im allgemeinen bietet die Analyse einer solchen Mutante keine Schwierigkeit: Die Extraktion mit PCP ergibt R-Form-; die anschließende Extraktion mit Phenol/Wasser S-Form-LPS.

3.2.3 Mehrfach-Mutanten: Frau Dr. Schlosshardt hat 1964 die Mutanten aus alten Kulturen isoliert und gelegentlich als Phagen-resistente Mutanten weiter selektioniert. Bei diesem Verfahren erhält man oft R-Mutanten mit zwei oder mehr Defekten. Bei mehreren Defekten wird der Phänotyp von demjenigen Defekt bestimmt, der auf dem Biosyntheseweg zuerst erreicht wird. Daß es sich um eine Mehrfach-Mutation handelt, wird bei der LPS-Analyse nicht ersichtlich, wohl aber, wenn man die Aktivität der Biosynthese-Enzyme bestimmt oder wenn man genetische Untersuchungen vornimmt.

So wurde früher gefunden (Risse et al., 1967), daß die Mutante rR541 zwei Defekte besitzt: (a) Ein Defekt betrifft die O-Ketten-Synthese: Es fehlt das Enzym UDP-GalNAc-4-Epimerase, welches UDP-GlcNAc in UDP-GalNAc umwandelt: Die Mutante synthetisiert keine freien O-spezifischen Ketten. (b) Ein zweiter Defekt betrifft die Glucose I-Transferase: Er bestimmt den Chemotyp des LPS, Rd1 (P⁺).

Ein anderes Beispiel ist die Re Mutante S.minnesota mR595 (Mäkelä et al., 1970). Ihr LPS enthält KDO und Lipoid A. Die Mutante hat 2 Defekte: (a) Ein noch nicht charakterisierter Defekt betrifft die Synthese oder den Transfer der Heptose I. (b) Ein zweiter Defekt betrifft die Synthese der O-Kette (und des Enterobacterial Common Antigens, ECA). Genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß der Genort rfe betroffen ist, von dem noch unbekannt ist, welches Enzym er determiniert.

Offensichtlich kommt es häufig vor, daß Mehrfachmutanten inkomplette Defekte besitzen. Solche Mutanten synthetisieren mehr als ein R-LPS und möglicherweise zusätzlich noch S-Form-LPS. Hier ist die Identifizierung und die Klassifikation der LPS-Mischung aufgrund der Zuckerzusammensetzung allein nicht möglich. Man müßte die LPSS trennen und sie einzeln analysieren genetische Untersuchungen durchführen oder Enzym-Defekte identifizieren.

3.2.4 Serologische Klassifizierung von R-LPSS: Die in Abb. 8 gezeigten Ra-Re LPSS sind serologisch unterscheidbar. Der immunodeterminante Zucker ist jeweils der nicht-reduzierende terminale Zucker des jeweiligen R-LPS. Die meisten Antikörper eines Antiserums sind gegen diese terminalen Strukturen gerichtet. Bei den in dieser Arbeit benutzten anti-R-Antiseren handelt es sich um R-Testseren (Ruschmann und Niebuhr, 1972). Sie waren durch Immunisierung mit den betreffenden R-Mutanten gewonnen worden. Alle Seren enthalten aber neben Antikörpern,

die gegen die terminalen Strukturen gerichtet sind, auch Antikörper-Quoten, die mit inneren Strukturen des LPS-Moleküls reagieren. So reagiert das anti-Ra-Serum am stärksten mit Ra-LPS, aber auch mit Rb-Re LPSS, wenn auch meist wesentlich schwächer. Aber auch ein Re Antiserum kann gelegentlich mit LPSS anderer Chemotypen reagieren. Zwar waren die verwandten Seren entsprechend absorbiert, aber die Entfernung aller "unspezifischen" Titer ist nicht möglich, wenn man nicht eine drastische Reduzierung des "spezifischen" Titers in Kauf nehmen will.

Die serologische Analyse ist in vielen Fällen ein gutes zusätzliches Mittel zur Charakterisierung von R-LPSS, aber häufig kann man damit allein nicht entscheiden, ob (a) eine Mischung von verschiedenen LPSS vorliegt und die verschiedenen Seren daher (im Wesentlichen) mit jeweils einem LPS reagieren oder ob (b) ein einheitliches LPS vorliegt und die verschiedenen Antiseren jeweils mit verschiedenen Strukturen dieses LPS reagieren.

3.2.5 Reaktion der LPSS mit Komplement: Wie in der Einleitung ausgeführt, reagieren viele LPSS mit Komplement (C'). Es ist jedoch nicht bekannt, welche LPS-Strukturen oder LPS-Eigenschaften die Reaktionsfähigkeit mit Komplement bedingen. Viele Beispiele haben gezeigt (Galanos und Lüderitz, 1976), daß Re-LPSS (vor allem als Na- oder Ca-Salze, also in hochaggregierter Form)^{*)} Komplement inaktivieren, während Ra- und Rb-LPSS (5 oder 6 bislang getestete) unabhängig von der Salzform inaktiv sind. Der C'-Inaktivierungstest wurde deshalb als zusätzliches Mittel zur Charakterisierung der LPSS benutzt.

^{*)} Im Vergleich zum Triäthylamin-Salz (siehe Galanos und Lüderitz 1976).

3.3 Im folgenden sollen zunächst zwei Klassen von Mutanten besprochen werden, die bei den untersuchten R-Mutanten nicht aufgefunden wurden.

3.3.1 UDP-Galaktose-4-Epimerase-(Gal-epi⁻)-Mutanten: Diese Klasse von R-Mutanten wurde zuerst bei E.coli (Kalckar, 1965), später bei S.typhimurium (Osborn, 1966) identifiziert. Die Unfähigkeit der Mutanten, Galaktose zu synthetisieren, hat zur Folge, daß die LPS-Synthese auf der Stufe des RcP⁺-LPS abbricht. In Gegenwart von Galaktose im Medium kann jedoch UDP-Gal aufgebaut und unter diesen Bedingungen komplettes LPS synthetisiert werden. Gal-epi⁻-Mutanten stellen ein wichtiges Forschungsobjekt dar (z.B. beim Studium des LPS-Biosynthesewegs).

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, ist es Frau Dr. Schlosshardt 1964 gelungen, R-Mutanten der Chemotypen Ra-Re zu isolieren. Eine RcP⁺ Mutante fehlte jedoch. Um eine solche Mutante (von S. minnesota) zu isolieren und damit die Serie komplett zu machen, hat Schlosshardt (unveröffentlicht) viele Versuche an S.minnesota Mutanten durchgeführt. Sie ist dann zu S.ruiru übergegangen und schließlich zu S.godesberg (dessen LPS dem S.minnesota LPS chemisch verwandt ist). In keinem Fall wurde eine Gal-epi⁻-Mutante isoliert. Es sollte vermerkt werden, daß auch später in vielen Laboratorien (G. Schmidt, Freiburg, H. Mäkelä, Helsinki, B.A.D. Stocker, H. Nikaido, USA) mit verschiedenen Methoden vergeblich versucht worden ist, von S.minnesota eine Gal-epi⁻-Mutante zu erhalten, was ohne Probleme gelingt, wenn man von S.typhimurium ausgeht. Der Grund hierfür ist unbekannt.

3.3.2 NDP-Heptose-6-Epimerase-Mutanten (Lehmann et al., 1973): Die in Salmonella-LPS vorkommende Heptose ist die L-Glycero-D-mannoheptose (L,D-Hep). Sie wird aus NDP- (das Nukleosid ist nicht bekannt)-D-glycero-D-mannoheptose (D,D-Hep) mittels einer

6-Epimerase gebildet. Bei einem Defekt dieser Epimerase entsteht eine Mutante, die neben Re-LPS ein zweites LPS vom Chemotyp Rd, synthetisiert, welches D,D-Hep enthält. Offensichtlich kann die L,D-Hep-Transferase auch die D,D-Heptose als Substrat verwenden. L,D-Hep und D,D-Hep können als Alditolacetate gaschromatographisch leicht unterschieden werden (Lehmann et al., 1973). In keinem der hier untersuchten R-LPSs wurde ein Peak gefunden, der D,D-Hep entspricht.

3.4 In den folgenden Paragraphen werden die partiell identifizierten R Mutanten der Tab. 11 diskutiert. Dabei ist das Gewicht jeweils auf die PCP-extrahierten G-Präparate gelegt, da sie im Bezug auf R-LPS reiner sind. Soweit G-Präparate zur Verfügung standen, sind nur sie in den folgenden Tabellen berücksichtigt. Abb. 16 zeigt 6 Gaschromatogramme, die typisch sind für verschiedene Chemotypen (Ra und Rb sind identisch).

3.4.1 Re Mutanten: Es wurden 15 Re Mutanten identifiziert (Abb. 16, Tab. 12). Die Re-LPSs enthalten KDO als einzigen Kernzucker, während die anderen Zucker (weitgehend) fehlen. Re-LPSs reagieren, soweit untersucht, mit Re-Serum und sie inaktivieren Komplement.

In Abb. 7 sind einige Schritte des Biosynthesewegs von Re-LPS dargestellt. Daraus geht hervor, daß man noch nicht entscheiden kann (Osborn et al., 1974), ob eine Vorstufe von Re-LPS mit 2-KDO-Resten existiert (Abb. 7, A). Wir haben die Re-LPSs in Tab. 12 entsprechend ihrem KDO-Gehalt geordnet. Man sieht, daß in den verschiedenen LPSs der KDO-Gehalt zwischen 1,8 und 3,3 Mol pro 2 Mole Glucosamin liegt. KDO-Bestimmungen an Re-LPSs sind an sich zuverlässig. Aber bevor man aus den vorliegenden Daten endgültige Schlüsse zieht, sollten die entsprechenden LPSs weiter gereinigt werden.

Tab. 12: R-Lipopolysaccharide, die aufgrund der Analysen zum Chemotyp Re gehören (vorläufige Klassifizierung, Anordnung nach dem Gehalt an KDO).

LPS aus	Mol KDO/ 2 Mole GlcN	4-Amino- arabinose	Serol. ¹⁾ Kreuzreakt. mit Re-Serum (μ g LPS)	Komplement ²⁾ Aktivität
mR 1001A G	1,8	5+	n.g.	100
gR 5 G	1,9	6+	31	100
gR 7 G	1,9	5+	4	100
coli Re G	2,0	-	8	n.g.
gR 10 G	2,0	4+	4	99
gR 4 G	2,3	3+	2	n.g.
gR 12 G	2,3	4+	17	99
gR 11 G	2,4	1+	17	100
gR 14 G	2,4	4+	8	97
gR 17 G	2,4	2+	n.g.	100
gR 8 G	2,5	4+	1	n.g.
gR 18 G	2,5	3+	n.g.	100
gR 13 G	2,7	4+	4	100
gR 16 G	2,8	1+	2	91
gR 9 G	3,3	5+	16	100

1) Minimale Menge LPS (μ g), die das Re-Hämagglutinationssystem von S. minnesota R595 hemmt.

2) Maximale Komplementlyse-Hemmung (%) mit 15-25 μ g LPS nach Überführung in das Na-Salz.

Alle Re LPSS hemmen das Hämagglutinations-Testsystem von mR 595 LPS/anti mR 595 Serum. Allerdings werden von einigen LPSS Mengen die größer als 10 µg sind benötigt. Möglicherweise spielt die Löslichkeit der Präparate eine Rolle, die vor allem bei dem relativ lipophilen Re-LPSS oft kritisch ist.

Alle Re-LPSS reagieren mit Komplement und inaktivieren C' mit 15-25 µg zu nahezu 100%. Die meisten Re-LPSS enthalten relativ viel 4-Aminoarabinose. Die in Tab. 12 beschriebenen Eigenschaften sprechen dafür, daß es sich um Re-LPSS handelt.

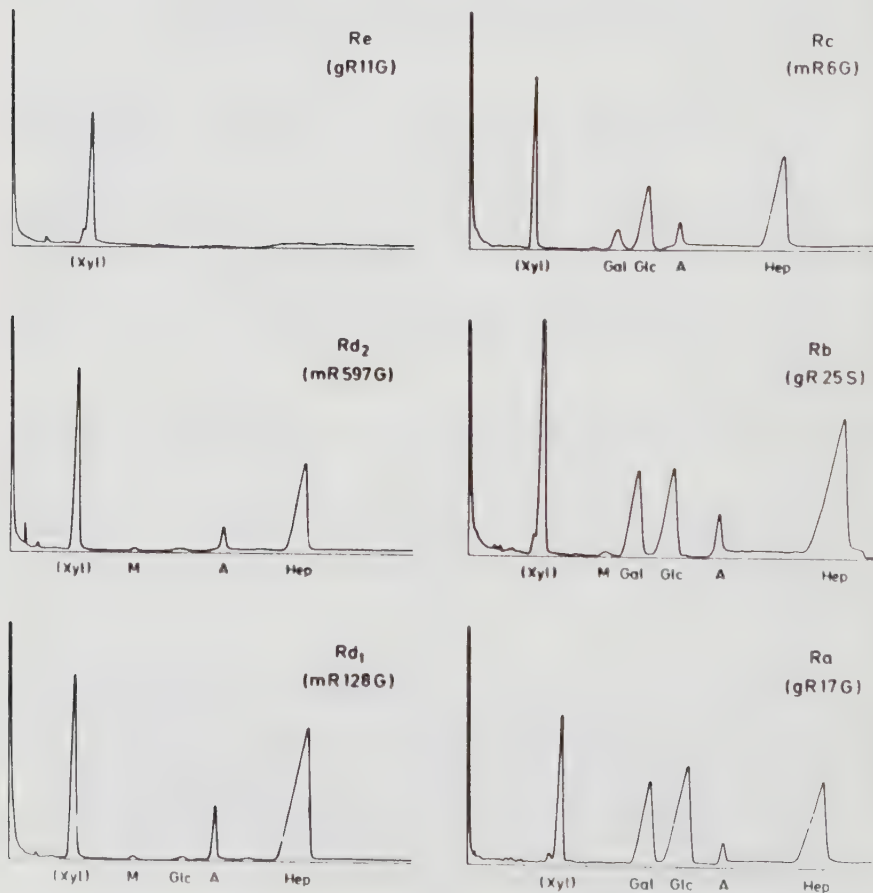
3.4.2 Rd Mutanten: Rd Mutanten synthetisieren ein LPS mit Heptose, KDO und Lipoid A. Bislang wurden zwei Rd-Chemotypen bekannt: Die LPSS von Rd₂ Mutanten enthalten 1, die von Rd₁ Mutanten 2 Heptosen pro 3 KDO-Lipoid A (Abb. 8). Wie oben (2.1.3) ausgeführt, ist die HepI — KDOII-Bindung sehr stabil. Infolgedessen werden bei Anwesenheit von Heptose im LPS von den 3 KDO-Einheiten nur 2 erfaßt. Das analytisch bestimmte Verhältnis Hep:KDO sollte demnach bei Rd₂-LPSS 1:2 und bei Rd₁-LPSS 1:1 sein.

Wie die Formel des Salmonella Kern-Oligosaccharids (Ra-LPS, Abb. 8) zeigt, enthält der Kern ein Heptosedisaccharid in der Hauptkette, und eine dritte Heptose in der Seitenkette, die allerdings nicht in äquimolarer Menge vorliegt. Die Frage, ob Salmonella Rd Mutanten existieren, die mehr als 2 Heptosen im LPS (2-3) besitzen, ist noch offen (vergl. Jann und Westphal, 1975).

In Tab. 13 (Abb. 16) sind diejenigen LPSS zusammengefaßt, die aufgrund des Analysenergebnisses als Rd-LPSS bezeichnet werden können. Aufgeführt sind diejenigen mit PCP-extrahierten Präparate, die KDO und Heptose, aber keine oder wenig Hexosen enthalten. Aufgrund der Heptose-Werte (in % angegeben) können Rd₂- (< 10% Hep) und Rd₁-LPSS (> 10% Hep) unterschieden werden. Die Unterteilung in Rd₁P⁻- und Rd₁P⁺-LPSS ist aufgrund der P-Werte nicht eindeutig möglich. Wie die letzte Spalte der

Abb. 16: Gaschromatogramme von LPSS typischer R-Chemotypen.

Die untersuchten Rc-LPSS enthielten alle kleine Mengen an Galaktose. Mannose (M) wird häufig in LPS-Präparaten gefunden; eine Erklärung dafür gibt es nicht. Ra- und Rb-LPSS sind gaschromatographisch nicht unterscheidbar. Der Artfakt (A) entsteht immer bei der Hydrolyse von L-glycero-D-mannoheptose und stellt wahrscheinlich eine Anhydro-Verbindung dar. Xylose wurde als innerer Standard zugegeben.



Tab. 13 zeigt, stimmen die serologischen Befunde mit der hier getroffenen Einteilung in 3 Gruppen überein. Ob das LPS gR 21 G mit fast 20% Heptose einem neuen Typ mit 3 Heptosen entspricht, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht sicher geschlossen werden. Es fällt auf, daß Rd₂-LPSS mehr 4-Aminoarabinose enthalten als Rd₁-LPSS.

Tab. 13: R-Lipopolysaccharide, die aufgrund der Analysen zum Chemotyp Rd gehören (vorläufige Klassifizierung)

LPS aus	Hep %	P %	4-Amino- arabinose	Hämagglutinations- titer in Serum		
				Rd ₂	Rd ₁ P ⁻	Rd ₁ P ⁺
<u>Rd₂-LPSS</u>						
rR 630 G	7,1	2,7	4+	<u>160</u>	40	Ø
mR 597 G	7,8	2,0	5+	<u>80</u>	Ø	Ø
mR 1000 G	6,8	2,6	6+	<u>640</u>	40	40
mR 1001B G	8,0	1,7	4+	<u>160</u>	Ø	Ø
 <u>Rd₁P⁻-LPSS</u>						
mR 7 G	13,0	2,1	3+	80	<u>640</u>	40
mR 128 G	16,2	1,4	-	20	<u>320</u>	40
 <u>Rd₁P⁺-LPSS</u>						
gR 3 G	16,8	3,0	+	320	40	<u>640</u>
gR 20 G	14,6	2,5	2+	40	40	<u>80</u>
gR 21 G	19,9	2,6	2+	Ø	20	<u>40</u>

3.4.3 Rc Mutanten: Rc-Mutanten synthetisieren ein LPS, welches durch die Abwesenheit von Galaktose charakterisiert ist. Es enthält Glucose, Heptose und KDO im Verhältnis 1:2-3:3, wobei nur 2 KDO-Reste analytisch erfaßbar sind. Außerdem sind 2-3 P-Reste bei RcP⁻ und mehr als 3 P-Reste bei RcP⁺-LPS vorhanden.

Tab. 14: R-Lipopolysaccharide, die aufgrund der Analysen zum Chemotyp Rc gehören (vorläufige Klassifizierung)

LPS aus	Glc	Hep	KDO	P	4-Amino- arabinose	Hämagglutinations- titer in Serum RcP ⁻	RcP ⁺
(Mol pro 2 Mole GlcN)							
<u>RcP⁻-LPSs</u>							
mR 5 G	1,4	2,4	1,6	3,1	2+	<u>5120</u>	160
mR 6 G	1,2	2,4	1,6	2,7	2+	<u>1280</u>	40
mR 592 G	1,0	1,6	1,0	1,7	2+	<u>1280</u>	160

RcP⁺-LPSs wurden nicht identifiziert.

Tab. 14 (Abb. 16) faßt die LPSs zusammen, welche aufgrund der chemischen Analysen als Rc charakterisiert sind. Aufgrund des P-Gehaltes wurden sie als P⁻ eingeordnet. Diese Einteilung stimmt mit den serologischen Befunden überein. Keine der Mutanten ist eine Gal-epi⁻-Mutante oder eine andere RcP⁺ Mutante.

3.4.4 Rb Mutanten: Ursprünglich war die Klasse der Rb Mutanten definiert als Glucosamin-Transferase-defekt (Lüderitz et al., 1965). Typischer Vertreter war die S.minnesota R345 Mutante (Rb₁, Abb. 8). Später konnte aufgrund der Ergebnisse der Kern-

strukturanalyse vorausgesagt werden, daß weitere Subklassen des Chemotyps Rb existieren müssen. Da jedoch die Sequenz der einzelnen Biosyntheseschritte sowie die strukturellen Bedingungen, die das wachsende LPS zum Akzeptor machen, noch unbekannt sind, kann keine Aussage über die Strukturen der theoretisch möglichen Rb-LPSs gemacht werden. Bislang sind zwei weitere Rb-LPSs charakterisiert worden, Rb₂ und Rb₃ (Abb. 8, Wilkinson und Stocker, 1968, Osborn, 1968).

Tab. 15: R-Lipopolysaccharide, die aufgrund der Analysen zum Chemotyp Rb gehören (vorläufige Klassifizierung)

LPS aus	Gal	Glc	Hep	KDO	4-Amino- arabinose	Hämagglutinations- titer in Serum	Komplement- aktivität	1)
	(Mol pro 2 Mole GlcN)					Rb	Ra	
mR 1 G	0,9	0,6	1,9	1,5	4+	∅	∅	40
gR 25 G	0,6	0,9	2,9	1,8	+	-	∅	39

1) Maximale Komplementlyse-Hemmung (%) mit 15-25 µg LPS nach Überführung in das Na-Salz.

Es stand uns nur ein Rb-(Rb₁)-Antiserum zur Verfügung. Wie Tab. 15 (Abb. 16) zeigt, wurden zwei LPSs gefunden, die Galaktose und Glucose enthalten. Beide reagieren nicht mit Rb-Antiserum. Die Tatsache, daß beide LPSs (Na-Salz) gegenüber Komplement kaum aktiv sind, paßt zu früheren Ergebnissen mit Rb-LPSs. Daß es sich hier um Rb₃-LPSs handelt, ist möglich.

3.4.5 Ra Mutanten: Diese Mutanten synthetisieren den kompletten Kern gebunden an Lipoid A. Im Ra-LPS ist daher das Verhältnis GlcN:Gal:Glc:Hep:KDO etwa 3:2:2:2-3:3. Da wir in Tab. 11 und 16 alle Werte auf Glucosamin = 2 bezogen haben und weiterhin nur 2 KDO-Reste bei der Analyse erfaßt werden, ergibt sich für Ra-LPSs ein Verhältnis von 2 GlcN:1,4 Gal:1,4 Glc:1,4-2,1 Hep:1,4 KDO.

Tab. 16 (Abb. 16) faßt LPSS zusammen, die Glucose und Galaktose enthalten und stark im Ra-Antiserum reagieren. Wie früher getestete Ra-LPSS reagieren auch diese LPSS (Na-Salz) relativ schwach mit Komplement und enthalten relativ wenig 4-Aminoarabinose.

Tab. 16: R-Lipopolysaccharide, die aufgrund der Analysen zum Chemotyp Ra gehören (vorläufige Klassifizierung).

LPS aus	Gal (Mol pro 2 Mole GlcN)	Glc	Hep	KDO	4-Amino- arabinose	Hämagglutinations- titer in Serum Rb Ra	Komplement- aktivität
gR 2 G	0,5	0,6	0,9	1,6	3+	Ø 1280	48
gR 23 G	1,9	2,6	2,9	1,7	2+	Ø 640	15
mR 3 G	1,7	1,5	3,4	1,9	+	640 5120	52
gR 6 G	2,3	4,1	5,0	1,7	+	Ø 1280	8
mR 2 G	2,4	1,4	5,7	1,4	-	640 2560	13
gR 17 G	1,7	3,6	5,4	1,9	2+	- 320	18

1) Maximale Komplementlyse-Hemmung (%) mit 15-25 µg LPS nach Überführung in das Na-Salz.

Die analytischen Daten schwanken sehr und weichen teilweise stark von den theoretischen Werten ab. Ein Grund hierfür kann nicht angegeben werden.

3.4.6 S-Form-LPSSs: 4 LPSS(s. Tab. 11) enthalten O-spezifische Zucker und stellen daher wahrscheinlich S-Form-LPSSs dar. Wie erwartet reagieren sie auch mit O-spezifischem Serum. Sie wurden nicht weiter untersucht.

3.4.7 Sonstige LPSSs: Bei 6 LPSS (in Tab. 11 ist der angegebene Chemotyp nicht unterstrichen) reichten die Analysedaten nicht aus, um eine plausible Klassifizierung vorzunehmen. Möglicherweise handelt es sich hier um LPS-Mischungen aus Doppelmutanten

3.5 Schlußbemerkung:

In der vorliegenden Arbeit sind eine Reihe von R-Form-LPSs chemisch, serologisch und hinsichtlich ihrer C'-Aktivität analysiert worden. Die erhaltenen Daten reichen nicht aus, eine definitive Klassifizierung in die R-Chemotypen Ra-Re vorzunehmen oder mit Sicherheit auf das Auffinden neuer Mutanten zu schließen. Eine vorläufige Klassifizierung der LPS ist jedoch möglich gewesen (Tab. 11 bis 16). Die Befunde legen es nahe, daß Vertreter einer neuen Klasse von Mutanten vom Chemotyp Re (mit 2 statt 3 KDO-Resten) und eine neue Mutante vom Chemotyp Rd mit 3 Heptose-Resten gefunden wurde.

Defekte LPSs beanspruchen noch immer das Interesse von Chemikern, Biochemikern, Biologen und Genetikern. Wenn in Zukunft der Bedarf nach speziellen Mutanten aufkommt, bieten die Ergebnisse dieser Arbeit die Möglichkeit in der hier bearbeiteten Sammlung gezielt nach solchen Mutanten zu suchen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Bakterienstämme und ihre Züchtung:

Aus den Stämmen Salmonella minnesota, Salmonella godesberg, Salmonella ruiyu und Escherichia coli waren 1963 Serien von R-Mutanten isoliert worden (Schlosshardt, 1964; Lüderitz et al., 1966). Die Bakterien wurden nach Schlecht et al. (1968); Ring und Schlecht (1970) gezüchtet.

4.2 Extraktion der Lipopolysaccharide:

Die Lipopolysaccharide der Wild-Stämme (S-Form) wurden mit Phenol/Wasser (Westphal et al., 1952) extrahiert, während die Lipopolysaccharide der R-Formen mit Phenol/Chloroform/Petroläther (PCP) (Galanos et al., 1969) isoliert wurden. Häufig wurden Bakterien mit PCP und (anschließend) mit Phenol/Wasser behandelt.

4.3 Elektrodialyse und Salz-Formen von Lipopolysacchariden:

Die Elektrodialyse wurde, wie von Galanos und Lüderitz (1975) beschrieben, mit einigen Änderungen ausgeführt. Es wurde das Modell SM 163531 ($\varnothing = 13$ cm, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) benutzt. Die mittlere Kammer enthielt einen Silicon Schlauch (Spirale), durch den Kühlflüssigkeit gepumpt wurde. Die LPSS-Proben (20 mg/8 ml) wurden in die mittlere Kammer pipettiert, die zwei äußeren Kammern mit dest. H₂O gefüllt. Wenige Minuten nach Einschalten des Stroms (200 V, 40 mA) begann das pH der kathodischen Kammer, wohin die Kationen wanderten, zu steigen. Das Wasser der äußeren Kammern wurde gewechselt, wenn das pH im kathodischen Raum auf mehr als 11 gestiegen war. Das pH der anodischen Kammer blieb unverändert. Nach ca. 4 h

änderte sich das pH nicht mehr. Das elektrodialysierte, saure LPS wurde gesammelt, mit Base neutralisiert und lyophilisiert. Abb. 9 (siehe Einleitung) zeigt schematisch das Prinzip der Elektrodialyse eines LPS.

4.4 Analytische Methoden:

4.4.1 Allgemeine Methoden:

Totalglucosamin wurde nach Hydrolyse in 4 N HCl (100°C) nach Strominger et al. (1959) bestimmt.

Totalphosphat sowie freies (anorganisches) Phosphat (z.B. nach Phosphomonoesterase-Behandlung) wurden mit Ammoniummolybdat-Reagenz nach Lowry et al. (1954) bestimmt. KDO wurde mit der Thiobarbitursäure nach Waravdeker und Saslaw (1959) bestimmt. Heptose wurde nach Dische (1963) in der Abwandlung von Osborn (1964) bestimmt.

4.4.2 Polyamine:

Solubilisierung aus Lipopolysacchariden: 5 mg LPS wurden in 0,10 ml 10 N HCl bei 0°C für 2 min ultrabeschallt und dann für 15 Sekunden auf 100°C gebracht. Die Röhrchen wurden danach sofort ins Eiswasser (0°) gestellt und 0,4 ml Wasser wurde zugegeben. Nach Zentrifugation (15 min, 1000 UpM) wurde 400 µl klarer Überstand abpipettiert und im Exikator mit KOH evaporiert. Der Rückstand wurde in 30 µl Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA 0,05 mg/ml H₂O) gelöst und so für die elektrophoretischen und kolorimetrischen Bestimmungen der Amine benutzt.

Die Bestimmung der Gesamt-Amine mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) wurde nach Dubin (1969) durchgeführt. Spermin (0,01 M in EDTA/H₂O) diente als Standard. Zur Bestimmung der einzelnen Amine wurde das Amin-Gemisch und ein Standardgemisch der Papier-

elektrophorese unterworfen. Nach Anfärben mit Ninhydrin/Lutidin/Äthanol (65°C, 22 min; Dubin und Rosenthal, 1960) wurden die Flecke ausgeschnitten und mit 2 ml 71% Äthanol eluiert. Dann wurde die Extinktion bei 575 nm gemessen.

4.4.3 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose:

10 mg LPS wurden in 0,5 N HCl bei 37°C für 24 h hydrolysiert, die Proben zentrifugiert und 350 µl der Überstände am Rotationsverdampfer getrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und der Papierelektrophorese unterworfen. Anfärbung mit Ag^+/OH^- oder Ninhydrin.

4.4.4 Dünnschichtchromatographie und Papierelektrophorese:

Für Zellulose-Platten (selbst angefertigt) wurde als Laufmittel Pyridin:n-Butanol:Wasser (4:6:3 v/v) oder Äthylacetat: Pyridin:Essigsäure:Wasser (5:5:1:3 v/v) mit Äthylacetat: Pyridin:Wasser (40:11:6 v/v) zur Sättigung der Atmosphäre benutzt. Zur Zuckeranalyse wurde LPS mit 400 µl 1N H_2SO_4 (100°C, 4 h) hydrolysiert und mit Ionenaustauscher (IRA 410 HCO_3^- -Form) neutralisiert. Für Aminozucker wurde mit 4N HCl (100°C, 10 h) hydrolysiert. Die Zucker wurden mit Silbernitrat-Alkali nach Trevelyan et al. (1950) oder Ninhydrin angefärbt.

Die Papierelektrophorese wurde nach Kickhöfen und Warth (1968) durchgeführt (10°C, 3000 V, 60 min). Puffer für 4-Aminoarabinose: Pyridin/Eisessig/Wasser (10:4:86, v/v, pH 5,4); Puffer für Polyamine: der gleiche wie oben oder Natrium-

tartrat, pH 4,7 (15 g Weinsäure in 700 ml Wasser, mit 5N NaOH auf pH 4,6 gebracht, auf 1 l Wasser aufgefüllt und mit 1N NaOH auf pH 4,7 gebracht).

4.4.5 Gaschromatographie der Fettsäuren:

Zur Veresterung der Fettsäuren wurden die Diazomethan- (Mangold et al., 1958) und die Bortrifluorid/Methanol-Methode (Duron und Nowotny, 1963) angewandt.

Diazomethan-Methode: Zur Isolierung der freien Fettsäuren wurden 5 mg LPS + 1 mg Heptadecansäure (C_{17} , als Standard) mit 1 ml 4N NaOH im abgeschmolzenen Röhrchen für 5 h bei 100°C erhitzt. Während der Hydrolyse wurde das Röhrchen mehrmals geschüttelt (Whirlmix). Das alkalische Hydrolysat wurde anschließend angesäuert. Die freien Fettsäuren wurden in einem Scheidetrichter 3 mal mit Chloroform extrahiert. Die Na_2SO_4 getrocknete Chloroformphase wurde in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Zur Veresterung (Mangold et al., 1958) wurde Diazomethan in ätherischer Lösung verwendet. Darstellung (Organikum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1965a): In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 20 ml Äther und 4 ml 40% KOH auf etwa 0°C gebracht und unter Umschwenken 2 g Nitrosomethylharnstoff (Organikum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1965b) gegeben. Nach 5 min hatte sich die Ätherphase stark gelb gefärbt, sie wurde vorsichtig in ein vorgekühltes Gefäß dekantiert und für 1 h über festem KOH getrocknet. Von der ätherischen Diazomethanlösung wurden 0,5 ml unter Zusatz von 0,005 ml Methanol (Schlenk und Gellermann, 1960) zu einer ätherischen Lösung der freien Fettsäuren gegeben. Der Äther wurde darauf mit Hilfe eines Luftstromes entfernt.

Bortrifluorid-Methode: Die Umesterung mit Bortrifluorid/Methanol wurde nach der Vorschrift von Duron und Nowotny (1963)

durchgeführt. 3 mg LPS wurden mit 500 µl Bortrifluorid/Methanol-Komplex (14% w/v) im abgeschmolzenen Röhrchen für 6 h bei 100°C gekocht. Nach Zugabe von 500 µg Heptadecansäuremethylester (als Standard) wurde das Röhrchen mehrmals gut geschüttelt (Whirlmix). Dann wurden 0,3 ml gesättigte NaCl-Lösung und 0,3 Petroläther (Kp: 40° - 60°C) zugesetzt und nach Mischen und Zentrifugation die obere Schicht abgenommen und noch zweimal mit Petroläther extrahiert. Die Extrakte wurden getrocknet.

Gaschromatographie (Rietschel et al., 1975; Kaufman et al., 1961): der Fettsäuremethylester in Chloroform wurde bei einer Injektortemperatur von 250°C in den Gaschromatographen (Varian Aerograph Series 1400) eingespritzt. Das Substanzgemisch wurde an einer Glassäule (Castorwax, 2,5% auf Chromosorb G, 1,5 m 1/8 inch) bei 190°C (isotherm), mit Stickstoff als Trägergas (30 ml/min) aufgetrennt und über einen Flammenionisationsdetektor (FID), an den ein Integrator (Hewlett. Packard 3380A) gekoppelt war (Papiervorschub 0,5 cm/min), registriert.

4.4.6 Gaschromatographie der Zucker:

2 mg LPS wurden in 1 ml 0,1N HCl für 48 h bei 100°C hydrolysiert. Nach Zugabe von 100 µg Xylose (als Standard) wurde das Hydrolysat mit Ionenaustauscher (IRA 410 HCO₃⁻-Form) neutralisiert, in einen Spitzkolben filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Zucker wurden dann mit 1 ml Natriumborhydrid-Lösung (5 mg/ml Wasser) für 1-3 h bei Zimmertemperatur reduziert, mit Dowex 50 H⁺-Form behandelt und wieder am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Borsäure wurde 3 mal mit 2 ml Methanol entfernt. Die Zucker wurden mit 0,5 ml Pyridin + 0,5 ml Essigsäureanhydrid für 15 min bei 100°C acetyliert, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und mit Wasser mehrmals gewaschen und konzentriert. Die acetylierten Zuckeralkohole wurden in destilliertem Chloroform (15 µl)

aufgenommen und etwa 1 μ l in den Gaschromatographen (Varian Aerograph Series 1400) eingespritzt. Das Substanzgemisch wurde an einer Glassäule (ECNSS-M 3%, 1,5 x 1/8 inch) bei 170°C und 190°C mit Stickstoff als Trägergas (30 ml/min) aufgetrennt und über einen Flammenionisationsdetektor (FID), an den ein Integrator (Hewlett. Packard 3380A) gekoppelt war (Papiervorschub 0,5 cm/min), registriert.

4.5 Biologische Tests:

4.5.1 Komplement-Fixations-Test (Komplement-Inaktivierung):

Für den Komplement-Fixations-Test wurde die Methode von Galanos und Lüderitz (1976) angewandt. In einer Duplikat-Reihe wurden 50 μ l unverdünntes Meerschweinchenserum (Komplementquelle) mit 14 μ g bzw. 24 μ g LPS, die jeweils in 7 μ l bzw. 12 μ l Wasser gelöst waren, versetzt. Die Mischung wurde auf 20 μ l mit Veronal-Puffer pH 7,3 (Kabat und Mayer, 1961) verdünnt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde mit 90 μ l Veronal-Puffer verdünnt. Von jeder Lösung wurden dann 10 μ l entnommen und zu einer Mischung von 1 ml Veronal-Puffer und 0,5 ml mit Ambozeptor (anti-Schaf-Erythrozyten-Antikörper) sensibilisierte Schaf-Erythrozyten pipettiert. Die gleiche Menge Erythrozyten hatte nach Lyse in dest. H₂O eine Extinktion bei 546 nm von 1,3 - 1,4. Nach Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37°C wurden die einzelnen Proben zentrifugiert und die Extinktionen der Überstände bei 546 nm gemessen. Kontrollen enthielten kein LPS (C' Lyse = 100%) oder kein C'. Die Komplement-inaktivierende Aktivität des LPS wurde als Prozent Lysehemmung angegeben.

4.5.2 Hämagglutinations- und Hämagglutinations-Hemmungs-Test:

Der Hämagglutinationstest wurde nach Beckman et al., 1964, durchgeführt. LPS-sensibilisierte Erythrozyten wurden mit LPS-

spezifischem Antiserum agglutiniert. Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurde die zu untersuchende Substanz in verschiedenen Konzentrationen mit dem Antiserum vorinkubiert, und dann das Ausbleiben der Agglutination bestimmt.

5 WIRKUNG VON Co^{60} -GAMMA-BESTRAHLUNG AUF
CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG UND BIOLOGISCHE
EIGENSCHAFTEN VON SALMONELLA MINNESOTA R595
LIPOPOLYSACCHARID

5.1 Einleitung:

In den letzten Jahren hat sich die Arbeitsgruppe von Bertók am Radiologischen Institut der Universität Budapest mit der Frage der Detoxifizierung von Endotoxinen beschäftigt. Dies ist eine Frage, die viele Forscher seit langem beschäftigt und die in der Vergangenheit mit mehr oder weniger Erfolg mit verschiedenen Mitteln angegangen worden ist. Das Ziel war immer, durch chemische oder physikalische Maßnahmen das Endotoxin so zu verändern, daß unerwünschte Wirkungen (Schock, Blutdruckveränderungen etc.) verschwinden, und andere erwünschte (Antigenität, Immunogenität, Tolerogenität etc.) erhalten bleiben. Bertók et al. haben die Gamma-Bestrahlung der Endotoxine angewandt und Präparate mit solchen Eigenschaften erhalten. Die Versuche waren jedoch an relativ unreinen Endotoxinpräparaten durchgeführt worden. Prof. Dr. Bertók hat seine Untersuchungen dann an einem Lipopolysaccharid wiederholt, daß in Freiburg hergestellt worden war. Es war ein möglichst einfaches LPS ausgewählt worden, nämlich das einer Re Mutante, welches nur KDO und Lipoid A enthält.

An diesem Programm habe ich teilgenommen. Ich habe das LPS isoliert und gereinigt, und später die Bestrahlungsprodukte aus Budapest analysiert (Galanos et al., 1978).

5.2 Ergebnisse:

Salmonella minnesota R595 (Re-LPS) wurde mit PCP extrahiert und nach Elektrodialyse in das Triäthylamin (TEN)-Salz überführt. Proben des Präparats wurden im Institut von Prof. Dr. Bertók in

Budapest einer Co^{60} -gamma-Bestrahlung von 0, 5, 10, 15 und 20 Megarad unterworfen. Dabei lagen die LPSs in Lösung (30 mg LPS/ml H_2O) vor. Die bestrahlten Proben wurden nach Freiburg geschickt und hier chemisch und biologisch analysiert.

5.2.1 Chemische Analyse:

Die vier bestrahlten LPS-Proben wurden gegen Wasser (2 Tage) dialysiert. Die Ausbeuten nach Lyophilisieren von Außen- und Innendialysat sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

<u>S.minn.</u>	Innendialysat	Außendialysat
R595 LPS	mg	
5 Megarad	23,25	1,40
10 Megarad	21,60	2,20
15 Megarad	24,00	3,06
20 Megarad	21,70	5,40

Tab. 17: Ausbeute an gamma-bestrahlten LPSs, Außen- und Innendialysat.
Ausgangsmenge, je 30 mg.

Tab. 18 enthält die Ergebnisse der chemischen Analyse der bestrahlten, dialysierten LPSs. Während sich der Gehalt an Phosphat nicht und der von Glucosamin wenig verändert hat, ist der Gehalt an Fettsäuren und KDO stark vermindert, und zwar entsprechend der Bestrahlungsdauer. Auch 4-Aminoarabinose ist teilweise zerstört (Abb. 17). Wie Tab. 18 zeigt, wird während der Bestrahlung ein Teil des Phosphats Phosphatase-spaltbar. Die braune Farbe der Lösungen auch nach Dialyse, sowie der Abfall der Summe der bestimmbar Bausteine in den Präparaten läßt darauf schließen, daß Degradierungsprodukte noch im Molekül gebunden sind.

Tab. 18: Zusammenfassung der Analyseergebnisse an Original- und Co⁶⁰-gamma-bestrahlten Salmonella minnesota R595-LPSS.

Werte: % bezogen auf LPS. GlcN: Morgan-Elson Bestimmung, P: Lowry Methode, KDO: Thiobarbitursäure-Methode und Fettsäuren: Bortrifluorid/Methanol-Methode. Gesamt 3-OH-C₁₄ = 3-OH-C₁₄ + Δ^2 C₁₄ + 3-CH₃-O-C₁₄. (Pase = Phosphomonoesterase).

S. minn.	% GlcN	% P	Total Pase sens.	% KDO	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	% Fettsäuren Gesamt 3-OHC ₁₄	Summe Bausteine Fetts.	% Summe 4-Aran
R595 LPS										
Original	9,0	2,5	0,0	16,0	10	15	6	27	58	85,5
5 Megarad	8,5	2,5	0,3	12,5	9	8	5	23	45	68,5
10 Megarad	8,0	2,5	0,5	10,5	9	9	4	22	44	66,0
15 Megarad	7,5	2,5	0,5	9,5	7	8	4	20	39	58,5
20 Megarad	6,5	2,5	0,5	8,0	8	8	3	15	34	51,0
Verlust (bez. auf Original = 100%)	28	00		50	20	47	50	44	41	40

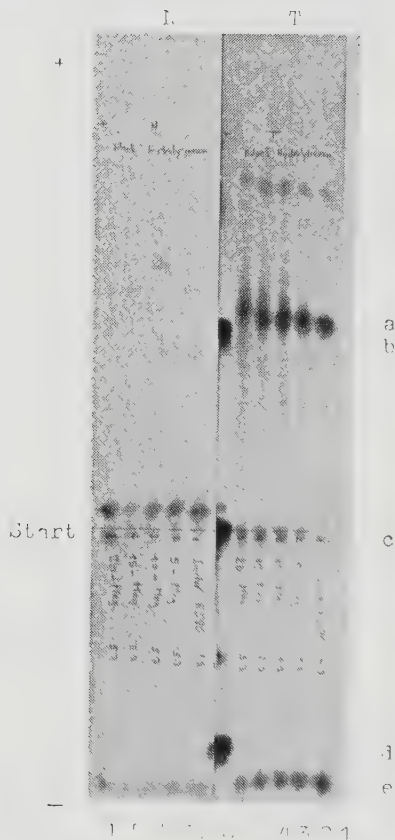


Abb. 17: Papierelektrophoretische Darstellung von 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPSS von S. minn. R595 vor und nach Bestrahlung. LPSS wurden in 0,5 N HCl bei 37°C für 24 h hydrolysiert. S: Standard (b; Glc-6-P, c; Glc u. d; GlcN); a; KDO und e; 4-AraN; 1,2,3,4,5: S. minn. R595-LPSS bestrahlt mit 0, 5, 10, 15 und 20 Megarad. Anfärbung mit Ninhydrin (N) und Ag^+/OH^- (T).

5.2.2 Biologische Analyse (Komplement-Inaktivierung):

Die Aktivität der bestrahlten Proben und des Ausgangsmaterials (R595-LPSS als Na-Salze nach Dialyse) gegenüber Komplement wurde getestet. Wie Abb. 18 zeigt, wurden unter den angewandten Bedingungen 50% des vorgegebenen Komplement von etwa 4 μg Original-LPS inaktiviert. Von den bestrahlten Proben (5, 10, 15 und 20 Megarad) wurden für den gleichen Effekt ca. 4, 5, 7 und 22 μg benötigt.

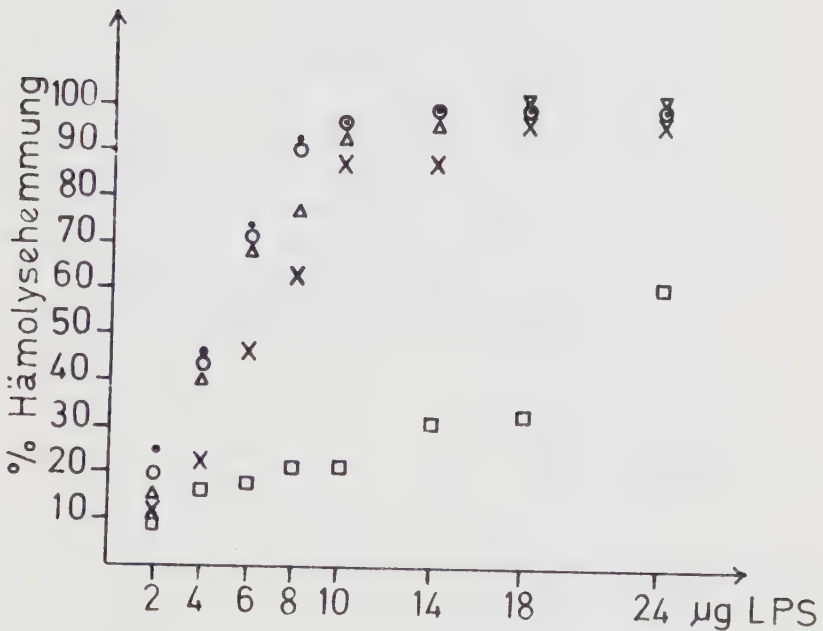


Abb. 18: Komplement Aktivität von Salmonella minnesota R595 LPSS.

Original (.), 5 Megarad (o), 10 Megarad (Δ), 15 Megarad (X) und 20 Megarad (◻).

5.3 Diskussion:

Die Analyseergebnisse der Co^{60} -gamma-bestrahlten Salmonella minnesota R595 LPSS (Tab. 18) zeigen, daß einzelne Bausteine, insbesondere KDO und Fettsäuren, zerstört wurden. Zum Beispiel nimmt der KDO- und Total-Fettsäure-Gehalt in der 20 Megarad-Probe um 50 bzw. 41 % ab. Bei GlcN sind es 28%. Die Summe der analysierten Bausteine ist in der 20 Megarad-bestrahlten Probe um etwa 40 % vermindert. Auch 4-Aminoarabinose wird durch die Bestrahlung zunehmend zerstört. Die Degradierungsprodukte, die noch im LPS gebunden sind, wurden nicht identifiziert. Die Veränderungen, die im Lipoid A-Teil auftreten, bedingen biologische Veränderungen. Der Aktivitätsabfall der LPSS nach Bestrahlung gegenüber Komplement ist ein Beispiel dafür. Das war auch der Fall bei E.coli 089 LPS (Füst et al., 1977). Im Labor von Dr. Bertók wurde weiter gezeigt, daß die lethale Toxizität der LPSS abnimmt. Die lokale Schwarzman-Wirkung der bestrahlten LPSS-Präparate ist eine weitere Endotoxineigenschaft, die stark vermindert ist. Dagegen ist die Fähigkeit Toleranz hervorzurufen, unbeeinflußt. Ebenso ist die Adjuvanswirkung erhalten (Füst et al., 1977); Szilágyi et al., 1978). Diese Befunde sind von theoretischem und möglicherweise praktischem Interesse.

5.4 Material und Methoden:

(s. Kap. 4).

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Bayer, M.E. und Anderson, T.F., 1965,
Reprinted from the Proceedings of the National Academy
of Sciences, Vol. 54, No. 6, pp. 1592-1599
- 2) Beckmann, I., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1964,
Biochem.Z. 339, 401
- 3) Braun, V. und Hantke, K., 1974,
Ann.Rev.Biochem. 43, 89-121
- 4) Bryn, K. und Rietschel, E.Th., 1978,
Eur.J.Biochem. 86, 311-315
- 5) Costerton, J.W., Ingram, J.M. und Cheng, K.J., 1974,
Bacteriol.Rev. 38, 87-110
- 6) Dankert, M., Wright, A., Kelley, W.S. und Robbins, P.W.,
1966, Arch.Biochem.Biophys. 116, 425
- 7) Decad, G.M. und Nikaido, H., 1976,
J.Bacteriol. 128, 325-336
- 8) Dische, Z., 1963,
J.Biol.Chem. 204, 983
- 9) Dubin, D.T., 1960,
J.Biol.Chem. 235, 783
- 10) Dubin, D.T. und Rosenthal, S.M., 1960,
J.Biol.Chem. 235, 776
- 11) Duron, O.S. und Nowotny, A., 1963,
Anal.Chem. 35, 370-372
- 12) Eidels, L., Rick, P.D., Stimler, N.P. und Osborn, M.J.,
1974, J.Bacteriol. 119, 138
- 13) Freer, J.H. und Salton, M.R., 1971,
Microbial Toxins, Vol. IV, Acad.Press. Inc., New York,
p. 67-122, In: G. Weinbaum, S. Kadis und S.J. Ajl (eds.)
- 14) Füst, G., Bertók, L. und Inhász-Nagy, S., 1977,
Infection and Immunity, 16, 26-31
- 15) Galanos, C., Bertók, L., El-Sabbagh, M. und Füst, G., 1978,
4th European immunology meeting, Budapest, Ungarn,
Abstr. p. 105
- 16) Galanos, C. und Lüderitz, O., 1975,
Eur.J.Biochem. 54, 603

- 17) Galanos, C. und Lüderitz, O., 1976,
Eur.J.Biochem. 65, 403
- 18) Galanos, C., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1969,
Eur.J.Biochem. 9, 245
- 19) Galanos, C., Rietschel, E.Th., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1971,
Biochem. 19, 143
- 20) Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.Th. und Westphal, O., 1977,
International Review of Biochemistry, Biochemistry of Lipids II, Vol. 14, Edited by T.W. Goodwin, University Park Press Baltimore. London. Tokyo, p. 239-335
- 21) Gmeiner, J., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1969,
Eur.J.Biochem. 7, 370
- 22) Hase, S. und Rietschel, E.Th., 1977,
Eur.J.Biochem. 75, 23-34
- 23) Jann, K. und Westphal, O., 1975,
Reprinted from: The Antigens, Vol.III, Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London, pp. 1-125
- 24) Heath, E.C., 1971,
Ann.Rev. of Biochem. 40, 29
- 25) Kabat, E.A. und Mayer, M., 1961,
Methods of Immunochemistry (2nd edition), Thomas Springfield (III), S. 133
- 26) Kalckar, H.M., 1965,
Science, 150, 305
- 27) Kasai, N., Hayashi, Y. und Komatsu, N., 1970,
Jap.J.Med.Sci.Biol. 23, 361
- 28) Kauffmann, F., 1954,
"Enterobacteriaceae" Munksgaard, Copenhagen
- 29) Kauffmann, F., 1961,
"Die Bakteriologie der Salmonella Species", Munksgaard, Copenhagen
- 30) Kauffmann, F., Lüderitz, O., Stierlin, H. und Westphal, O., 1960,
Zbl.Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I.Abt., Orig. 178, 442

- 31) Kaufman, H.P., Mankel, G. und Lehman, K., 1961,
Fette, Seifen, Anstrichmittel, 12, 1109
- 32) Kickhöfen, B. und Warth, R., 1968,
J.Chromatogr. 33, 558
- 33) Lehmann, V., Hämmerling, G., Nurminen, M., Minner, I.,
Ruschmann, E., Lüderitz, O., Tseng-Tong, K. und
Stocker, B.A.D., 1973,
Eur.J.Biochem. 32, 268-275
- 34) Lehmann, V., Redmond, J., Egan, A. und Minner, I., 1978,
Eur.J.Biochem. 86, 487-496
- 35) Lowry, O.H., Roberts, N.R., Leiner, K.Y., Wu, M.L. und
Farr, A.L., 1954,
J.Biol.Chem. 207, 1
- 36) Lüderitz, O., 1970,
Angew.Chem., 82, 708
- 37) Lüderitz, O., Jann, K. und Wheat, R., 1968,
Comprehensive Biochemistry, Vol. 26A, 105
- 38) Lüderitz, O., Staub, A.M. und Westphal, O., 1966,
Bacteriol.Rev. 30, 192
- 39) Lüderitz, O., Galanos, C., Risse, H.J., Ruschmann, E.,
Schlecht, S., Schmidt, G., Schulte-Holtzhausen, H.,
Wheat, R., Westphal, O. und Schlosshardt, J., 1966,
Ann.N.Y.Acad.Sci. 133, 277
- 40) Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. und Nikaido, H.,
1971,
Microbial Toxins, Vol. IV, Acad.Press, New York, p. 145-
233, in: G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl (eds.)
- 41) Lüderitz, O., Risse, H.J., Schulte-Holtzhausen, H.,
Strominger, J.L., Schutherland, I.W. und Westpahl, O., 1965,
J.of Bacteriol. 89, 343
- 42) Mäkelä, P.H., Jankola, M. und Lüderitz, O., 1970,
J.Gen.Microbiol. 60, 91
- 43) Mäkelä, P.H. und Sarvas, M., 1969,
in "Strukture et effets biologiques des produits bactériens
provenant de germes gram négatifs" Coll. Paris Oct. 1976,
p. 201, C.N.R.S. Paris
- 44) Malchow, D., Lüderitz, O., Kickhöfen, B., Westphal, O.
und Gerisch, G., 1969,
Eur.J.Biochem. 7, 239

- 45) Mangold, H.K., Gellerman, J.L. und Schlenk, H., 1958,
Federation Proc. 17, 268
- 46) Mühlradt, P.F. und Golecki, J.R., 1975,
Eur.J.Biochem. 51, 343-352
- 47) Mühlradt, P.F., Menzel, J., Golecki, J.R. und Speth, V.,
1974,
Eur.J.Biochem. 43, 533-539
- 48) Mühlradt, P.F., Wray, V. und Lehmann, V., 1977,
Eur.J.Biochem. 81, 193-203
- 49) Munson, R.S., Rosmaussen, N.S. und Osborn, M.J., 1978,
J.Biol.Chem. 253, 1503-1511
- 50) Naide, Y., Nikaido, H., Mäkelä, P.H., Wilkinson, R.G.
und Stocker, B.A.D., 1965,
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 53, 147
- 51) Nakae, T. und Nikaido, H., 1975,
J.Biol.Chem. 250, 7359-7365
- 52) Nikaido, H., 1973,
Biosynthesis and assembly of LPS and the outer membrane
layer of gram-negative cell wall, p.131-208, in: L. Leive
(ed.): Bacterial membranes and walls, Marcel Dekker,
Inc. New York
- 53) Nikaido, H., Nikaido, K. und Mäkelä, P.H., 1966,
Ann.N.Y.Acad.Sci. 133, 299
- 54) Organikum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften,
Berlin, 1965a, S. 528
- 55) Organikum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften,
Berlin, 1965b, S. 512
- 56) Osborn, M.J., 1963,
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 50, 499
- 57) Osborn, M.J., 1966,
Ann.N.Y. Acad.Sci. 133, 375
- 58) Osborn, M.J., 1968,
Nature, 217, 957
- 59) Osborn, M.J., Rick, P.D., Lehmann, V., Rupprecht, E.
und Singh, M., 1974,
Ann.N.Y., Acad.Sci. 235, 52

- 60) Osborn, M.J. und Rothfield, L.I., 1971,
Microbial Toxins, Vol. IV, Acad.Press., New York, p. 331-350, in: G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl (eds.)
- 61) Redmond, J. und Galanos, C.,
(unveröffentlichte Angaben)
- 62) Rietschel, E.Th, Galanos, C. und Lüderitz, O., 1975,
Reprinted from Microbiology 1975 (D. Schlessinger (ed.)),
American Society for Microbiology, Washington D.C.,
p. 307
- 63) Rietschel, E.Th., Gottert, H., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1972,
Eur.J.Biochem. 28, 166-173
- 64) Rietschel, E.Th., Hase, S., King, M.T., Redmond, J. und
Lehmann, V., 1977,
Microbiology 1977 (D. Schlessinger (ed.)), American
Society for Microbiology, Washington D.C., p. 247
- 65) Ring, K. und Schlecht, S., 1970,
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A. 213, 103-119
- 66) Risse, H.J., Lüderitz, O. und Westphal, O., 1967,
Eur.J.Biochem. 1, 233
- 67) Robbins, P.W. und Wright, A., 1971,
Microbial Toxins, Vol. IV, Acad.Press. New York,
p. 351-368 in: G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl (eds.)
- 68) Romeo, D., Girard, A. und Rothfield, L., 1970,
J.Mol.Biol. 53, 475
- 69) Ruschmann, E. und Niebuhr, C., 1972,
Zbl.Bakt.Hyg., Abt.I Orig. A 222, 326-341
- 70) Schlecht, S., Ring, K., Kutscher, J. und Eschweiler, W.,
1968,
Zbl.Bakt.I.Orig. 206, 246
- 71) Schlenk, H. und Gellerman, J.L., 1960,
Anal.Chem. 32, 1412
- 72) Schlosshardt, J., 1964,
Zentr.Baktiol.Parasitenk., Abt.I.Orig. 192, 54
- 73) Schnaitman, C.A., 1971,
J.Bacteriol. 108, 553-563
- 74) Strominger, J.L., Park, J.T. und Thompson, R.E., 1959,
J.Biol.Chem. 234, 3263

- 75) Szilágyi, T., Csernyâszky, H., Gazdy, E. und Bertök, L., 1978,
Acta.Microbiol.Acad.Sci.Hung. (in press)
- 76) Trevelyan, W.E., Procter, D.P. und Harrison, J.S., 1950,
Nature 166, 444
- 77) Volk, W.A., Galanos, C. und Lüderitz, O., 1970,
Eur.J.Biochem. 17, 223-229
- 78) Waravdekar, V.S. und Saslaw, L.D., 1959,
J.Biol.Chem. 234, 1945
- 79) Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, L., Saltmarsh-
Andrew, M., Osborn, M.J. und Horecker, B.L., 1965,
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 54, 228
- 80) Westphal, O., Gmeiner, J., Lüderitz, O., Tanaka, A. und
Eichenberger, E., 1969,
Coll.Int.Centre Natl.Rech.Sci. 174, 69
- 81) Westphal, O. und Lüderitz, O., 1953,
VI. Intern.Congr.Microbiol. Vol. 2, p. 22-27
- 82) Westphal, O., Lüderitz, O. und Bister, F., 1952,
Z.Naturforschg. 7b, 148
- 83) Wilkinson, R.G. und Stocker, B.A.D., 1968,
Nature 217, 955
- 84) Wright, A., Dankert, M. und Robbins, P.W., 1965,
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 54, 235
- 85) Zeleznick, L.D., Rosen, S.M., Saltmarsh,Andrew, M.,
Osborn, M.J. und Horecker, B.L., 1965,
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 53, 207

LEBENS LAUF

Am 1.4.1947 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Mohammed El-Sabbagh und seiner Frau Aischa Al-Raie, in Kairo/Ägypten, geboren.

Von 1951 bis 1963 besuchte ich die Grundschule und das Gymnasium.

Von 1963 bis 1967 immatrikulierte ich mich an der Ain-Shams-Universität in Kairo für das Studium der Chemie und Biochemie.

Am 15. Juli 1971 heiratete ich meine Frau Olfat Mahfouz und am 5. August 1972 ist unser Sohn Amr El-Sabbagh geboren worden.

Im Mai 1973 legte ich meine "Magister"-Arbeit in Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. E. A. Eisa an der Ain-Shams-Universität in Kairo ab (Titel: "Protein metabolism in deficient conditions").

Im April 1974 hatte ich als DAAD-Stipendiat in Lüneburg die deutsche Sprache am Goethe-Institut erlernt.

Von Januar 1975 bis Oktober 1978 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg unter der Leitung von Prof. Dr. O. Westphal und Dr. O. Lüderitz an der vorliegenden Dissertation.

